

Dünnschichtchromatographie und
Radioimmunoassay von
Angiotensin II und
Angiotensin II - (3-8)-hexapeptid

Dr.rer.nat. Udo Walter

1975

Aus der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg
Universität Mainz (Dir. Prof. Dr. H.P. Wolff)

Dünnschichtchromatographie und Radioimmunoassay von
Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg Universität Mainz, den Medizinischen Fachbe-
reichen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Udo Walter
aus Mainz

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. E. Straub
Referent: Prof. Dr. A. Distler
Korreferent: Prof. Dr. D. Lommer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.6.1975

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung	1
II. Materialien und Geräte	8
III. Methoden	11
III.1. Angiotensin II-Antiserum	11
III.1.1. Kopplung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II an Kaninchen Serum Albumin	11
III.1.2. Immunisierung von Kaninchen	11
III.1.3. Titerbestimmung der Antiseren	12
III.1.4. Kreuzreaktion	12
III.2. Markierung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ¹²⁵ J	12
III.2.1. Jodination	12
III.2.2. Überprüfung der Reaktionsausbeute	13
III.2.3. Reinigung der jodierten Antigene	13
III.2.4. Überprüfung des Reinheitsgrades der radiojodierten Antigene	14
III.2.4.1. Bioassay	14
III.2.4.2. Elektrophorese	14
III.3. Radioimmunoassay	15
III.4. Probanden und Entnahme der Blutproben	16
III.5. Extraktion von Angiotensin II und seiner Metabolite aus Plasma	17
III.5.1. Extraktion mit Fullers Erde	17
III.5.2. Extraktion mit Amberlite IRC 50	17
III.5.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2	17
III.5.3.1. Verwendung von nicht gewaschenem Dowex	17
III.5.3.2. Verwendung von gewaschenem Dowex	18
III.6. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	18
III.6.1. Elektrofokussierung	18
III.6.1.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten	18
III.6.1.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel	19
III.6.2. Chromatographische Verfahren	20
III.6.2.1. Papierchromatographie	20
III.6.2.1.1. Trennung von ¹²⁵ J-Angiotensin II und ¹²⁵ J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	20
III.6.2.1.2. Trennung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	21
III.6.2.2. Dünnschichtchromatographie	21

III.7. Bestimmung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid aus Plasma	22
IV. Ergebnisse	23
IV.1. Angiotensin II-Antiserum	23
IV.2. Markierung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ¹²⁵ J	26
IV.2.1. Überprüfung der Reaktionsausbeute für ¹²⁵ J	26
IV.2.2. Reinigung der radiojodierten Antigene	29
IV.3. Radioimmunoassay von Angiotensin und seinen Analogen	31
IV.3.1. Einfluß von ¹²⁵ J-Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II	31
IV.3.2. Einfluß von Antiserum	31
IV.3.3. Einfluß der Inkubationszeit mit Aktivkohle auf die Trennung des freien vom an den Antikörper gebundenen Antigen	33
IV.4. Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus Plasma	34
IV.4.1. Extraktion mit Fullers Erde	34
IV.4.2. Extraktion mit Amberlite IRC 50	34
IV.4.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2	37
IV.5. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	39
IV.5.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten	39
IV.5.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel	41
IV.5.3. Papierchromatographie	43
IV.5.3.1. Trennung von ¹²⁵ J-Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II von ¹²⁵ J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	43
IV.5.3.2. Trennung von nicht radioaktiv markiertem Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	44
IV.5.4. Dünnschichtchromatographie	44
IV.6. Bestimmung der arteriellen und venösen Plasmakonzentrationen von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	47
V. Diskussion	51
VI. Zusammenfassung	60
VII. Literatur	63
Danksagung	72

I E I N L E I T U N G

Das Dekapeptid Angiotensin I entsteht unter dem Einfluß von Renin durch enzymatische Hydrolyse des in der Leber gebildeten Reninsubstrats (74,83), auch Angiotensinogen genannt, das bei der Elektrophorese in der α_2 -Globulin-Fraktion wandert (89). Renin wird hauptsächlich in dem juxtaglomerulären Apparat der Niere synthetisiert (82) und lysosomal gespeichert (77). Hohe Reninaktivitäten wurden auch im Uterus und in der Placenta (43, 45), in der Leber (43), in den großen Arterien und Venen von Hund und Schwein (31, 43) und im Gehirn (37) gemessen. Das von Ganten et al. (37) im Gehirn von Ratte und Hund nachgewiesene Isorenin ist auch nach Nephrektomie des Versuchstieres noch in unverminderter Aktivität vorhanden, und da Renin die Blut-Hirn Schranke nicht passieren kann, muß seine Synthese im Gehirn angenommen werden.

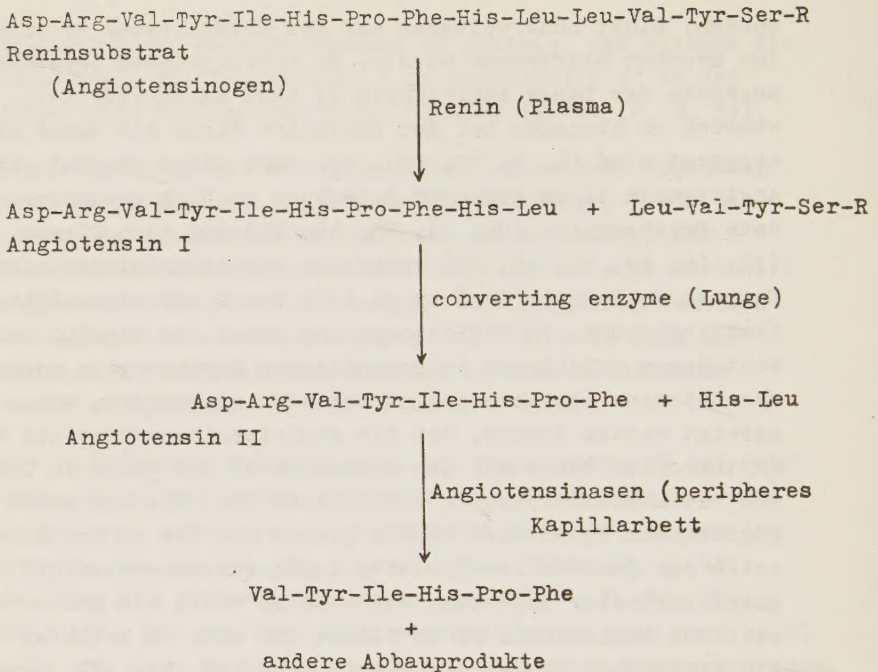
Wie zuerst Ng und Vane (75) und später Biron et al. (8) zeigen konnten, wird das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I während einer einzigen Passage durch das Kapillarbett der Lunge zu einem großen Teil in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Diese Aktivierung beruht auf der enzymatischen Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren Histidin und Leucin unter dem Einfluß des "converting enzyme". Cushman und Cheung (27) konnten bei der Ratte converting enzyme in allen Geweben außer in der Leber und dem Gastrocnemius nachweisen, jedoch enthielten mit fallender spezifischer Aktivität nur Epididymis, Testis und Lunge das Enzym in auffallend hoher Konzentration. Auch im Plasma von Mensch (64, 88, 90, 91), Pferd (95) und vielen anderen Säugetieren wurde converting enzyme Aktivität gemessen. Jedoch sind die Plasmakonzentrationen und die Konzentra-

tionen in den meisten Geweben so niedrig, daß alleine die Umwandlung des Angiotensin I in Angiotensin II in der Lunge eine biologische Rolle spielen dürfte (6, 9, 51).

Angiotensin II ist die pressorisch wirksamste Substanz, die bisher bekannt ist und wirkt auf molarer Basis ca. 40 mal so vasokonstriktorisch wie Noradrenalin (30). Desweiteren stimuliert es und insbesondere sein Metabolit Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid neben anderen Faktoren die Biosynthese von Aldosteron (10, 38, 61). Auch bei manchen Hypertonieformen scheint es eine ursächliche Rolle zu spielen.

Die biologische Halbwertszeit von Angiotensin II ist sehr kurz, da es mit großer Geschwindigkeit von verschiedenen Peptidasen vorwiegend im peripheren Kapillarbett von Leber (1, 16, 26, 54, 55, 63, 68, 69), Niere (3, 4, 16, 51, 54, 80), Extremitätenmuskulatur (4, 6, 9, 51, 78), Milz (16, 81) und Herz (80) abgebaut wird; nach Boyd et al. (13) und Cain et al. (20) soll sie etwa eine Minute betragen. Hodge et al. (51) gibt für Hunde als Halbwertszeit sogar nur eine Kreislaufzeit an, die ca. 15 Sekunden entspricht. Die oben angeführten Resultate beruhen auf Perfusionsstudien. Bei der Untersuchung des Metabolismus von Angiotensin II muß berücksichtigt werden, daß es nicht von Proteasen im Cytoplasma, sowie von Peptidasen in Lysosomen und an den Innenwandungen von Membranen hydrolysiert wird. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Angiotensin II aus dem Plasma nicht durch biologische Membranen diffundieren und somit von intrazellulär lokalisierten Enzymen abgebaut werden kann. Untersuchungen von Osborn et al. (78) stützen diese Annahme durch den Befund, daß (^{35}S)Phenylthiocarbamyl-valyl⁵-angiotensin II-amid nicht durch Erythrocytenmembranen diffundiert. Daher dürfen Ergebnisse, die mit Gewebshomogenaten gewonnen

wurden, nicht ohne weiteres auf den Metabolismus in intakten Geweben übertragen werden. So hydrolysieren Gewebshomogenate der Lunge Angiotensin II sehr rasch (53, 54), während es hingegen bei der Perfusion durch die Lunge nicht abgebaut wird (7, 9, 51, 62). Wie oben schon erwähnt wird Angiotensin II in geringem Maße auch im Blut gespalten, denn Erythrocyten (28, 53, 58, 60, 72) und auch Plasma (12, 50, 58, 59, 93, 94) enthalten angiotensininaktivierende Enzyme. So konnten Nast et al. (73) durch Ammoniumsulfatfraktionierung, pH-Variationen und unter dem Einfluß verschiedener Effektoren in menschlichen Erythrocyten sechs verschiedene lösliche Angiotensinasen nachweisen, wobei gezeigt werden konnte, daß die Angiotensinaseaktivität der Erythrocyten teils auf der Außenmembran und teils im Inneren der roten Blutkörperchen lokalisiert ist. Für den Abbau des Angiotensin II in vivo dürfte jedoch nur die an der Außenseite der Membran lokalisierte Angiotensinaseaktivität von untergeordneter Bedeutung sein. Da in vitro die Halbwertszeit von Angiotensin II im Plasma und auch im Vollblut um ein Vielfaches länger ist als in vivo (26, 51, 62), kann der enzymatische Abbau von Angiotensin II durch Enzyme im Blut nur eine unwesentliche Rolle spielen; daher spielt sich der Metabolismus von Angiotensin II in vivo im wesentlichen im peripheren Kapillarbett ab. Das unten angeführte Schema verdeutlicht die biochemischen Beziehungen des Renin Angiotensin Systems: Die in Klammern stehenden Organe kennzeichnen den hauptsächlichen Reaktionsort der enzymatischen Prozesse. Die angegebene Aminosäuresequenz des Angiotensins entspricht derjenigen des Menschen (2), des Pferdes (65, 96) und des Schweins (15). Rinder- (36) und Schafangiotensin (20) hat eine andere Primärstruktur und zeigt anstatt Isoleucin in Position 5 die Aminosäure Valin (36). Es ist jedoch zu betonen, daß beide Angiotensine im Tierversuch quantitativ gleichermaßen vasopressorisch wirken. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht auch kein Grund zur Annahme, daß Val⁵-Angiotensin II anders metabolisiert wird als Ile⁵-Angiotensin II (76).



Enzymatische Wege der Bildung und des Abbaus von Angiotensin

Als Mechanismus für die Inaktivierung von Angiotensin II in den peripheren Geweben wurden bisher die enzymatische Hydrolyse (53, 54, 63, 80), die Bindung an spezifische Rezeptoren (17, 21, 46, 100), die Aufnahme in die Zellen (80, 81) bzw. in den extrazellulären Raum (3, 81) diskutiert, wobei die enzymatische Hydrolyse die größte Rolle zu spielen scheint (63, 80). Keine der bisher beschriebenen Peptidasen spaltet Angiotensin II spezifisch; hydrolysiert ein Enzym irgendeine der sieben Peptidbindungen von Angiotensin II, so wird es üblicherweise Angiotensinase genannt. Von dem aus acht verschiedenen Aminosäuren aufgebauten Angiotensin II existieren insgesamt 35 verschiedene niedermolekulare Homo-

Aus der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg
Universität Mainz (Dir. Prof. Dr. H.P. Wolff)

Dünnschichtchromatographie und Radioimmunoassay von
Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg Universität Mainz, den Medizinischen Fachbe-
reichen

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Udo Walter
aus Mainz

Mainz 1975

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. E. Straub
Referent: Prof. Dr. A. Distler
Korreferent: Prof. Dr. D. Lommer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.6.1975

I. Einleitung	1
II. Materialien und Geräte	8
III. Methoden	11
III.1. Angiotensin II-Antiserum	11
III.1.1. Kopplung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II an Kaninchen Serum Albumin	11
III.1.2. Immunisierung von Kaninchen	11
III.1.3. Titerbestimmung der Antiseren	12
III.1.4. Kreuzreaktion	12
III.2. Markierung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ¹²⁵ J	12
III.2.1. Jodination	12
III.2.2. Überprüfung der Reaktionsausbeute	13
III.2.3. Reinigung der jodierten Antigene	13
III.2.4. Überprüfung des Reinheitsgrades der radio- jodierten Antigene	14
III.2.4.1. Bioassay	14
III.2.4.2. Elektrophorese	14
III.3. Radioimmunoassay	15
III.4. Probanden und Entnahme der Blutproben	16
III.5. Extraktion von Angiotensin II und seiner Metabolite aus Plasma	17
III.5.1. Extraktion mit Fullers Erde	17
III.5.2. Extraktion mit Amberlite IRC 50	17
III.5.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2	17
III.5.3.1. Verwendung von nicht gewaschenem Dowex	17
III.5.3.2. Verwendung von gewaschenem Dowex	18
III.6. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II- 18 (3-8)-hexapeptid	
III.6.1. Elektrofokussierung	18
III.6.1.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten	18
III.6.1.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel	19
III.6.2. Chromatographische Verfahren	20
III.6.2.1. Papierchromatographie	20
III.6.2.1.1. Trennung von ¹²⁵ J-Angiotensin II und ¹²⁵ J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	20
III.6.2.1.2. Trennung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	21
III.6.2.2. Dünnschichtchromatographie	21

III.7. Bestimmung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid aus Plasma	22
IV. Ergebnisse	23
IV.1. Angiotensin II-Antiserum	23
IV.2. Markierung von Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ¹²⁵ J	26
IV.2.1. Überprüfung der Reaktionsausbeute für ¹²⁵ J	26
IV.2.2. Reinigung der radiojodierten Antigene	29
IV.3. Radioimmunoassay von Angiotensin und seinen Analogen	31
IV.3.1. Einfluß von ¹²⁵ J-Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II	31
IV.3.2. Einfluß von Antiserum	31
IV.3.3. Einfluß der Inkubationszeit mit Aktivkohle auf die Trennung des freien vom an den Antikörper gebundenen Antigen	33
IV.4. Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus Plasma	34
IV.4.1. Extraktion mit Fullers Erde	34
IV.4.2. Extraktion mit Amberlite IRC 50	34
IV.4.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2	37
IV.5. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	39
IV.5.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten	39
IV.5.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel	41
IV.5.3. Papierchromatographie	43
IV.5.3.1. Trennung von ¹²⁵ J-Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II von ¹²⁵ J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	43
IV.5.3.2. Trennung von nicht radioaktiv markiertem Asn ¹ -Val ⁵ -Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	44
IV.5.4. Dünnschichtchromatographie	44
IV.6. Bestimmung der arteriellen und venösen Plasmakonzentrationen von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid	47
V. Diskussion	51
VI. Zusammenfassung	60
VII. Literatur	63
Danksagung	72

I E I N L E I T U N G

Das Dekapeptid Angiotensin I entsteht unter dem Einfluß von Renin durch enzymatische Hydrolyse des in der Leber gebildeten Reninsubstrats (74,83), auch Angiotensinogen genannt, das bei der Elektrophorese in der α_2 -Globulin-Fraktion wandert (89). Renin wird hauptsächlich in dem juxtaglomerulären Apparat der Niere synthetisiert (82) und lysosomal gespeichert (77). Hohe Reninaktivitäten wurden auch im Uterus und in der Placenta (43, 45), in der Leber (43), in den großen Arterien und Venen von Hund und Schwein (31, 43) und im Gehirn (37) gemessen. Das von Ganten et al. (37) im Gehirn von Ratte und Hund nachgewiesene Isorenin ist auch nach Nephrektomie des Versuchstieres noch in unverminderter Aktivität vorhanden, und da Renin die Blut-Hirn Schranke nicht passieren kann, muß seine Synthese im Gehirn angenommen werden.

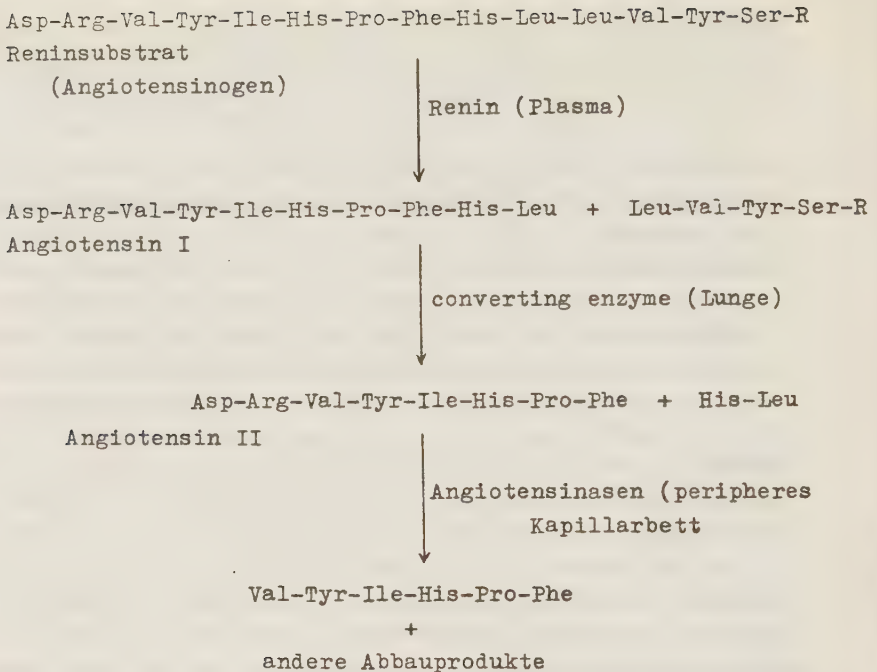
Wie zuerst Ng und Vane (75) und später Biron et al. (8) zeigen konnten, wird das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I während einer einzigen Passage durch das Kapillarbett der Lunge zu einem großen Teil in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Diese Aktivierung beruht auf der enzymatischen Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren Histidin und Leucin unter dem Einfluß des "converting enzyme". Cushman und Cheung (27) konnten bei der Ratte converting enzyme in allen Geweben außer in der Leber und dem Gastrocnemius nachweisen, jedoch enthielten mit fallender spezifischer Aktivität nur Epididymis, Testis und Lunge das Enzym in auffallend hoher Konzentration. Auch im Plasma von Mensch (64, 88, 90, 91), Pferd (95) und vielen anderen Säugetieren wurde converting enzyme Aktivität gemessen. Jedoch sind die Plasmakonzentrationen und die Konzentra-

tionen in den meisten Geweben so niedrig, daß alleine die Umwandlung des Angiotensin I in Angiotensin II in der Lunge eine biologische Rolle spielen dürfte (6, 9, 51).

Angiotensin II ist die pressorisch wirksamste Substanz, die bisher bekannt ist und wirkt auf molarer Basis ca. 40 mal so vasokonstriktorisch wie Noradrenalin (30). Desweiteren stimuliert es und insbesondere sein Metabolit Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid neben anderen Faktoren die Biosynthese von Aldosteron (10, 38, 61). Auch bei manchen Hypertonieformen scheint es eine ursächliche Rolle zu spielen.

Die biologische Halbwertszeit von Angiotensin II ist sehr kurz, da es mit großer Geschwindigkeit von verschiedenen Peptidasen vorwiegend im peripheren Kapillarbett von Leber (1, 16, 26, 54, 55, 63, 68, 69), Niere (3, 4, 16, 51, 54, 80), Extremitätenmuskulatur (4, 6, 9, 51, 78), Milz (16, 81) und Herz (80) abgebaut wird; nach Boyd et al. (13) und Cain et al. (20) soll sie etwa eine Minute betragen. Hodge et al. (51) gibt für Hunde als Halbwertszeit sogar nur eine Kreislaufzeit an, die ca. 15 Sekunden entspricht. Die oben angeführten Resultate beruhen auf Perfusionsstudien. Bei der Untersuchung des Metabolismus von Angiotensin II muß berücksichtigt werden, daß es nicht von Proteasen im Cytoplasma, sowie von Peptidasen in Lysosomen und an den Innenwandungen von Membranen hydrolysiert wird. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Angiotensin II aus dem Plasma nicht durch biologische Membranen diffundieren und somit von intrazellulär lokalisierten Enzymen abgebaut werden kann. Untersuchungen von Osborn et al. (78) stützen diese Annahme durch den Befund, daß (^{35}S)Phenylthiocarbamyl-valyl⁵-angiotensin II-amid nicht durch Erythrocytenmembranen diffundiert. Daher dürfen Ergebnisse, die mit Gewebshomogenaten gewonnen

wurden, nicht ohne weiteres auf den Metabolismus in intakten Geweben übertragen werden. So hydrolysieren Gewebshomogenate der Lunge Angiotensin II sehr rasch (53, 54), während es hingegen bei der Perfusion durch die Lunge nicht abgebaut wird (7, 9, 51, 62). Wie oben schon erwähnt wird Angiotensin II in geringem Maße auch im Blut gespalten, denn Erythrocyten (28, 53, 58, 60, 72) und auch Plasma (12, 50, 58, 59, 93, 94) enthalten angiotensininaktivierende Enzyme. So konnten Nast et al. (73) durch Ammoniumsulfatfraktionierung, pH-Variationen und unter dem Einfluß verschiedener Effektoren in menschlichen Erythrocyten sechs verschiedene lösliche Angiotensinasen nachweisen, wobei gezeigt werden konnte, daß die Angiotensinaseaktivität der Erythrocyten teils auf der Außenmembran und teils im Inneren der roten Blutkörperchen lokalisiert ist. Für den Abbau des Angiotensin II in vivo dürfte jedoch nur die an der Außenseite der Membran lokalisierte Angiotensinaseaktivität von untergeordneter Bedeutung sein. Da in vitro die Halbwertszeit von Angiotensin II im Plasma und auch im Vollblut um ein Vielfaches länger ist als in vivo (26, 51, 62), kann der enzymatische Abbau von Angiotensin II durch Enzyme im Blut nur eine unwesentliche Rolle spielen; daher spielt sich der Metabolismus von Angiotensin II in vivo im wesentlichen im peripheren Kapillarbett ab. Das unten angeführte Schema verdeutlicht die biochemischen Beziehungen des Renin Angiotensin Systems: Die in Klammern stehenden Organe kennzeichnen den hauptsächlichen Reaktionsort der enzymatischen Prozesse. Die angegebene Aminosäuresequenz des Angiotensins entspricht derjenigen des Menschen (2), des Pferdes (65, 96) und des Schweins (15). Rinder- (36) und Schafangiotensin (20) hat eine andere Primärstruktur und zeigt anstatt Isoleucin in Position 5 die Aminosäure Valin (36). Es ist jedoch zu betonen, daß beide Angiotensine im Tierversuch quantitativ gleichermaßen vasopressorisch wirken. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht auch kein Grund zur Annahme, daß Val⁵-Angiotensin II anders metabolisiert wird als Ile⁵-Angiotensin II (76).



Enzymatische Wege der Bildung und des Abbaus von Angiotensin

Als Mechanismus für die Inaktivierung von Angiotensin II in den peripheren Geweben wurden bisher die enzymatische Hydrolyse (53, 54, 63, 80), die Bindung an spezifische Rezeptoren (17, 21, 46, 100), die Aufnahme in die Zellen (80, 81) bzw. in den extrazellulären Raum (3, 81) diskutiert, wobei die enzymatische Hydrolyse die größte Rolle zu spielen scheint (63, 80). Keine der bisher beschriebenen Peptidasen spaltet Angiotensin II spezifisch; hydrolysiert ein Enzym irgendeine der sieben Peptidbindungen von Angiotensin II, so wird es üblicherweise Angiotensinase genannt. Von dem aus acht verschiedenen Aminosäuren aufgebauten Angiotensin II existieren insgesamt 35 verschiedene niedermolekulare Homo-

loge. Alle diese möglichen Verbindungen - mit Ausnahme des Angiotensin II-(2-8)-heptapeptids - haben offensichtlich keine momentane direkte biologische Wirksamkeit mehr, ob jedoch irgendwelche der niedermolekularen Homologe den vasopressorischen Effekt von Angiotensin II oder die Freisetzung von Aldosteron durch Angiotensin II beeinflussen, eventuell durch Anlagerung an die Angiotensinrezeptoren ist bisher noch nicht in allen Fällen geklärt und liegt durchaus im Bereich des Möglichen. Bisher ist auch noch nicht bekannt, ob alle und in welchem Ausmaß die 35 möglichen Metabolite in vivo entstehen. Über die im peripheren Kapillarnetz lokalisierten Angiotensinasen ist bisher wenig bekannt. Im Plasma jedoch wurden Angiotensin II hydrolysierende Amino-, Carboxy- und Endopeptidasen nachgewiesen (12, 50, 58, 59, 93, 94). Allein aus diesem Grund ist anzunehmen, daß auch alle theoretisch denkbaren niedermolekularen Homologe in vivo entstehen, wobei jedoch bestimmte Abbauschritte bevorzugt sein dürften. Dabei ist zu bedenken, daß die Metabolite, die in höchster Konzentration im Plasma vorliegen, nicht obligatorisch dem bevorzugten Abbauschritt entsprechen, was dadurch zu erklären wäre, daß im Sinne des stationären Zustandes die Abbaurate dieses Metaboliten gegenüber den anderen Angiotensinanalogen vermindert ist, woraus seine Anreicherung im Plasma resultieren würde. Nach Cain et al. (19) ist Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid das wichtigste immunoreaktive Abbauprodukt von Angiotensin II. Im Serum konnten bisher außer den einzelnen freien Aminosäuren auch die sieben verschiedenen Dipeptide identifiziert werden (66). Die sechs Tripeptide, fünf Tetrapeptide usw. sind infolge ihrer ähnlichen Größe, isoelektrischen Punkte und Löslichkeitseigenschaften äußerst schwierig voneinander zu trennen und somit nachzuweisen. Auch ihre direkte radioimmunologische Differenzierung ist nebeneinander kaum möglich, da Antikörper eine Kreuzreaktion zeigen dürften.

Die Bedeutung von Angiotensin II bei der Blutdruckregulation ist nicht in allen Einzelheiten geklärt. Zur Untersuchung der ätiologischen Rolle des Renin Angiotensin Systems bei verschiedenen klinischen und experimentellen Hypertonieformen scheint die direkte Bestimmung von Angiotensin II im Plasma der Messung der Reninaktivität überlegen zu sein, da die Beziehungen zwischen diesen beiden Größen zu komplex sind. Die eigentliche hypertensive Substanz ist das Angiotensin II. Die Konzentration dieses Oktapeptids im Plasma ist zum einen eine Funktion der Bildungsgeschwindigkeit und zum anderen hängt sie von der Abbaugeschwindigkeit des vasoaktiven Stoffes durch Angiotensinasen ab. Die Syntheserate wiederum ist direkt proportional der Konzentration von Renin und desweiteren bis zu gewissen Substratkonzentrationen auch proportional der Angiotensinogenkonzentration. Um weitere Einblicke in den Wirkungsmechanismus dieses Hormons auf die Blutdruckeinstellung zu gewinnen, ist es daher erforderlich zunächst eine Methode zu seiner quantitativen Bestimmung zu entwickeln, wobei jedoch nicht seine Abbauprodukte mit erfaßt werden sollen.

Bis vor wenigen Jahren konnte Angiotensin II nur im Bioassay über die blutige Blutdruckmessung an der Ratte bestimmt werden (85). Diese Methode wurde auch zur Messung der endogenen Plasmaangiotensin II-Spiegel herangezogen (11, 57, 67, 70, 71, 84), doch es zeigte sich, daß oft die endogenen Angiotensin II-Konzentrationen zu niedrig waren, um quantitativ genau erfaßt werden zu können. Daher haben zuerst Haber et al. (48) eine radioimmunologische Methode zur Bestimmung von Angiotensin II entwickelt, mit der eine quantitativ genaue Erfassung im pg-Bereich möglich ist. Verschiedene andere Laboratorien haben seither über ähnliche Methoden berichtet (12, 22, 35, 92, 99).

Das Prinzip des Radioimmunoassays beruht auf einer Konkurrenzreaktion eines Antigens und seiner radioaktiv markierten Form um die Bindungsstelle des spezifischen Anti-

körpers. Der Antikörper ist hierbei so beschaffen, daß er nicht zwischen radioaktiv markiertem und kaltem Hormon differenziert.

Prinzipiell können radioimmunologische Verfahren für alle Substanzen entwickelt werden, die immunologisch aktiv sind, d.h. die in einem lebenden Organismus die Bildung von gegen sie gerichteten Antikörpern induzieren. Hierbei sind insbesondere hochmolekulare Substanzen wie Proteine befähigt; niedermolekulare Stoffe, wie die meisten Hormone, besitzen jedoch selbst keinen antigenen Charakter, es sei denn sie werden an hochmolekulare Träger wie Proteine, Poly-L-Lysin oder Aktivkohle gekoppelt. Sie wirken hier als Haptene und bewirken bei Immunisierung eines Versuchstieres mit wiederholter Boosterung die Bildung von Antikörpern in einem hohen Titer.

Die bisher von den verschiedenen Autoren gewonnenen Antikörper gegen Angiotensin II zeigen gegenüber den niedermolekularen Angiotensin homologen, insbesondere dem Hepta-, Hexa- und auch sogar Pentapeptid, eine ausgeprägte Kreuzreaktion, während hingegen die höhermolekularen Verbindungen wie Angiotensin I und Angiotensinogen nur schwach antigenen Charakter haben (25, 33, 35, 87, 98). Es ist offensichtlich, daß zur isolierten Bestimmung von Angiotensin II im Plasma diese Antikörper nicht ohne weiteres geeignet sind.

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein radioimmunologisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Angiotensin II im Plasma mit einem Antikörper, der die oben beschriebene Kreuzreaktion zeigt. Mit Hilfe chromatographischer Verfahren wird eine Auftrennung des Angiotensin II und seiner immunoreaktiven Metabolite vorgenommen und somit deren isolierte radioimmunologische Bestimmung ermöglicht.

II. MATERIALIEN UND GERÄTE

Kaninchen Serum Albumin, Pentex, Kankakee, Illinois
Neomycinsulfat, Serva, Heidelberg
N-aethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, Fluka AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
Freund-Adjuvans, Behringwerke, Marburg
(5-Aethyl)-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure, Nembutal^R, Abbott
Aethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (Na₂EDTA), Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Natrium-¹²⁵Jodid, Hoechst, Frankfurt/Main
Chloramin T, BDH Poole, England
Natriummetabisulfit, BDH Poole, England
Kaliumjodid, Merck, Darmstadt
5,5-Diaethylbarbitursäure, Merck, Darmstadt
5,5-Diaethylbarbitursäure Natriumsalz, Merck, Darmstadt
DEAE-Sephadex A-25, Pharmacia, Uppsala
Trishydroxymethylaminomethan, Merck, Darmstadt
Human Albumin, Behringwerke, Marburg
Norit A, Serva, Heidelberg
Furosemid (Lasix^R), Hoechst, Frankfurt/Main
o-Phenanthrolin, Sigma, St. Louis, Missouri
Fuller Erde, Roth, Karlsruhe
Ammoniak 25%, Merck, Darmstadt
Methanol, Merck, Darmstadt
Amberlite IRC-50, Serva, Heidelberg
Dowex 50W-X2 100 - 200 mesh, Bio Rad, Griffin, Richmond, Calif.
Ampholine Carrier Ampholytes pH 3-10, 5-8, 6-8, 3-6, 7-9, 4-6, 8-10, LKB
Saccharose, Merck, Darmstadt

Aethylendiamin, Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, Merck, Darmstadt
Salzsäure, Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig), Merck, Darmstadt
o-Phosphorsäure, Merck, Darmstadt
Natronlauge, Merck, Darmstadt
Acrylamid, Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid, Serva, Heidelberg
Kaliumperoxodisulfat, Merck, Darmstadt
n-Butanol, Merck, Darmstadt
Acetessigsäureäthylester, Merck, Darmstadt
Diaethyläther zur Narkose, Merck, Darmstadt
DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (20 mal 20 cm), Merck,
Darmstadt
Whatman 3 MC Chromatographiepapier, Machery und Nagel,
Düren
weiße Neu-Seeland Kaninchen
Sprague Dawley Ratten

Absorptionsphotometrie:

Photometer LKB 8300 A Uvicord II mit Registrierung durch
Fallbügelschreiber, LKB 6520, LKB Produkter AB, Schweden
pH-Messung:

Orion Research Model, 701-digital pH-meter

Dünnschichtchromatographie:

TLC Multi-Spotter und Unimetrics-Mikroliterspritzen
UM 5100 TLC, Machery und Nagel, Düren

Radioaktivitätsmessung:

Tracerlab Spectromatic Gamma/guard 150

Zentrifuge:

MSE Mistral 6 L

Inkubation des Plasmas:

Rotationsapparat Typ RM 18, IKA-Werk, Janke und Kunkel
KG, Staufen, Breisgau

Trocknung der Eluate:

Thermostat 3401, Eppendorf, Hamburg

Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel:

LKB 2117 Multiphor-Gerät, LKB-Produkter AB, Schweden

Elektrofokussierung im Dichtegradienten:

Elektrofokussiersäule LKB 8101 (110 ml), LKB-Produkter AB,
Schweden

Gradientenmischer:

Gradientenmischer LKB 8121 (110 ml), LKB-Produkter AB,
Schweden

Schlauchpumpe:

Varioperpex LKB 12000, LKB-Produkter AB, Schweden

Zentrifuge:

MSE Mistral 6 L, MSE, England

Papierelektrophorese:

Niederspannungselektrophoresegerät voKam SAE 2761,
Shandon, England

III. M E T H O D E N

III.1. Angiotensin II-Antiserum

III.1.1. Kopplung von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II an Kaninchen-Serum-Albumin

Asn¹-Val⁵-Angiotensin II wurde nach der Methode von Goodfriend et al.(42) an Kaninchen-Serum-Albumin gekoppelt. Hierzu wurden 30 mg Asn¹-Val⁵-Angiotensin II, 15 mg Kaninchen-Serum-Albumin und 8 mg Neomycinsulfat in 4 ml über Quarz bidestilliertem Wasser gelöst und mit 4 ml einer Lösung von 450 mg N-Aethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbo-diimid-hydrochlorid versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Zimmertemperatur wurde dreimal je 12 Stunden gegen 2 Liter 0,9%ige Kochsalzlösung dialysiert. Der Dialyserückstand wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf 30 ml verdünnt und in Aliquots von 0,5 ml bei -18°C eingefroren.

III.1.2. Immunisierung von Kaninchen

Alle zwei bis vier Wochen wurden weiße Neu-Seeland Kaninchen durch wiederholte Injektionen einer Emulsion von 0,5 ml an Kaninchen-Serum-Albumin gekoppeltem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II und 0,5 ml Freund'schem Adjuvans immunisiert. Das Antigen wurde bei den einzelnen Injektionen intramuskulär und subcutan appliziert. Unmittelbar vor jeder Boosterung entnahmen wir aus den Ohrvenen Blutproben zur Titerbestimmung. Nach etwa sechs Monaten wurden die Kaninchen mit 5-Aethyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure (Nembutal) anaesthetisiert und über Polyäthylenkatheter, die durch die arteria carotis in den linken Ventrikel eingeführt waren, entblutet. Zur Vermeidung der Gerinnung wurde das Blut in einer isotonen Lösung (3,8%) von Na₂EDTA (0,2 ml/10 ml Blut) aufgefangen. Nach Zentrifugation wurde das Plasma bei -18°C eingefroren.

III.1.3. Titerbestimmung der Antiseren

Mit 0,2 ml Konstriktionspipetten wurden von dem Plasma der immunisierten Kaninchen Verdünnungsreihen angesetzt, wobei sich die Antiserum-Konzentrationen der unmittelbar aufeinanderfolgenden Verdünnungen um den Faktor zwei unterschieden. Jedem Röhrchen wurden 0,1 ml $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ in einer absoluten Menge von 5 000 cpm zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden bei 4°C erfolgte die radioimmunologische Bestimmung, wobei die Radioaktivität des nicht an den Antikörper gebundenen Antigens gemessen wurde. Als Titer wird die Verdünnung bezeichnet, bei der das radioaktiv markierte Antigen zu 50% an das Antiserum gebunden ist.

III.1.4. Kreuzreaktion

Zur Bestimmung der Kreuzreaktion der Antiseren gegenüber verschiedenen Angiotensinanalogen wurden Verdünnungsreihen mit den Angiotensinanalogen angesetzt und mit $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ und Antiserum über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes vom nicht an den Antikörper gebundenen Antigen erfolgte die Auswertung bei 50%iger Bindung des markierten Angiotensin II an den Antikörper.

III.2. Markierung von $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ^{125}J

III.2.1. Jodination

$\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden nach der Methode von Greenwood et al. (44) mit Na^{125}J markiert. Als Lösungsmittel diente 0,05 molarer Phosphatpuffer, pH 7,5. In möglichst schneller Reihenfolge wurden zu 2 mCi Na^{125}J in 50 μl mit Konstriktionspipetten 5 μg $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ (bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid) in 25 μl , 100 μg Chlora-

min T in 25 μ l, 240 μ g Natriummetabisulfit in 100 μ l und 6 mg KJ in 0,6 ml zugesetzt. Während der gesamten Reaktion, die etwa eine Minute dauerte, wurde das Reaktionsgefäß auf einem mechanischen Mischer geschüttelt.

III.2.2. Überprüfung der Reaktionsausbeute

Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs wurden nach dem Verfahren von Düsterdieck et al.(35) 0,1 ml des 800-fach verdünnten Reaktionsansatzes auf Whatman 3 MC Chromatographiepapier (3 mal 35 cm) übertragen und in einem 0,07 molaren Natriumbarbituratpuffer bei pH 8,6 über 50 Minuten bei 250 Volt elektrophoretisch getrennt. Das Chromatogramm wurde in 1 cm breite Streifen zerschnitten, die zur Berechnung der Reaktionsausbeute im Gamma-Counter Tracerlab gezählt wurden.

III.2.3. Reinigung der radiojodierten Antigene

Die Ionenaustauscherchromatographie über DEAE-Sephadex A-25 ermöglicht nach Düsterdieck et al.(34) die vollständige Abtrennung des $^{125}\text{Asn}^1\text{-Val}^5$ -Angiotensin II von seinem nicht radioaktiv markierten Analogen und dem nicht umgesetzten ^{125}J . Nach erfolgter Jodination wurde das Reaktionsgemisch sofort auf eine 20 cm lange und 1 cm breite DEAE-Sephadex A-25 Chromatographiesäule übertragen, die vorher mit einer 0,03 molaren Trishydroxymethylaminomethan-Pufferlösung pH 7,5 equilibriert wurde. Der Puffer enthielt weiterhin 0,2% Neomycinsulfat und 0,5% Humanalbumin. Als Elutionsmittel diente die gleiche Pufferlösung. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen; durch Messung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde der Verlauf der Elution verfolgt. Zur Vermeidung von Damage durch radioaktive Autolyse wurden die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität mit dem Elutionspuffer 1 : 10 verdünnt und bei -18°C eingefroren.

III.2.4. Überprüfung des Reinheitsgrades der radiojodierten Antigene

III.2.4.1. Bioassay

Zur Bestimmung der Konzentrationen von nicht markiertem Angiotensin II in den Fraktionen der Sephadex-Eluate wurden diese mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und im Bioassay auf ihre Blutdruckwirksamkeit an der anaesthetisierten Ratte nach der Methode von Peart (85) überprüft. Die 150 bis 200 g schweren Versuchstiere wurden 24 Stunden vor Verwendung beidseits nephrektomiert. Die Ratten wurden mit Nembutal anaesthetisiert, die Trachea intubiert, ein Katheter in die vena femoralis zur Injektion der zu testenden Lösungen und ein zweiter Katheter zur blutigen Blutdruckmessung in die arteria carotis eingeführt. Die Blutdruckwerte wurden mit Hilfe eines automatischen Schreibers registriert. Als Eichlösung diente Hypertensin Ciba, dessen Blutdruckwirksamkeit mit der zu messenden Probe verglichen wurde.

Eine Differenzierung zwischen markiertem und nicht markiertem Angiotensin II ist möglich, weil die Jodierung nach der oben beschriebenen Methode die pressorische Aktivität von Angiotensin II, wie Untersuchungen von Barbour und Bartter (5) und Düsterdieck et al.(35) zeigten, aufhebt.

III.2.4.2. Elektrophorese

Jeweils 10 μ l der Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität aus dem Sephadex-Eluat wurden auf Whatman 3 MC Chromatographiepapier (3 mal 35 cm) übertragen und bei 250 Volt und Raumtemperatur in einem 0,07 molaren Barbitursäurepuffer bei pH 8,6 elektrophoretisch getrennt. Die Trenndauer betrug 50 Minuten. Nach dem Lauf wurde das Papier in 1 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen.

Für den Radioimmunoassay wurden die Sephadex-Eluate verwendet, die frei von nicht markiertem Angiotensin II waren und bei der Papierelektrophorese nur ein einziges Aktivitätsmaximum zeigten. Die antigenen Eigenschaften des markierten Hormons wurden durch Inkubation von 5000 cpm $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ mit 0,2 ml 1 : 16 000 verdünntem Antiserum überprüft. Hierbei wurde nach einer 14 stündigen Inkubationszeit die an den Antikörper gebundene radioaktive Antigenmenge bestimmt.

III.3. Radioimmunoassay

Mit $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ wurden jeweils drei Verdünnungsreihen von 400 bis 3,1 pg bzw. von 1000 bis 3,9 pg angefertigt. Benachbarte Proben einer Verdünnungsreihe unterschieden sich bezüglich ihrer Konzentration um den Faktor zwei. Zunächst wurden in acht Röhrchen 0,2 ml eines 0,2 molaren Trispuffers, pH 7,5, vorgelegt. Der Puffer enthielt desweiteren 0,2% Neomycinsulfat und 0,3% Humanalbumin. Zu dem ersten Röhrchen der Verdünnungsreihe wurden mit einer Konstriktionspipette 800 pg $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ in 0,2 ml Trispuffer zupipettiert. Nach Durchmischung und Spülung der Pipette wurden diesem Röhrchen 0,2 ml entnommen und dem zweiten Röhrchen zugegeben. Dieser Pipettiervorgang wurde bei allen Röhrchen der Verdünnungsreihe wiederholt. Nach dem Pipettieren des letzten Röhrchens wurden die restlichen 0,2 ml verworfen.

Bei der Bestimmung des Angiotensingehaltes unbekannter Proben wurde anstelle der $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ Standardlösung 0,2 ml der unbekannten Probe eingesetzt.

Anschließend wurden allen Röhrchen 0,2 ml des 1 : 16 000 verdünnten Antiserums und 5000 cpm $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ in 0,1 ml bidestilliertem Wasser zugesetzt. Die Proben wurden 14 Stunden bei 4°C inkubiert.

Die Trennung des freien Angiotensin II von dem an den Antikörper gebundenen erfolgte nach der Methode von Düsterdieck et al.(35) durch Zugabe von 1 ml einer Suspension von 4 g Norit A in 360 ml 0,05 molarem Trispuffer pH 7,5, der 40 ml menschliches Plasma enthielt. Es wurde sofort geschüttelt und in der Kühlzentrifuge bei 2000 U/min zentrifugiert. Stets wurde darauf geachtet, daß zwischen Zugabe der Kohlesuspension und Beginn der Zentrifugation nicht mehr als 15 Minuten vergingen. Der im Überstand befindliche Antigen-Antikörper-Komplex wurde abgesaugt und verworfen, die an der Aktivkohle adsorbierte Aktivität des freien Antigens wurde im Gamma Counter Tracerlab gezählt.

III.4. Probanden und Entnahme der Blutproben

Die fünf gesunden normotensiven männlichen Probanden im Alter von 20 bis 25 Jahren erhielten zunächst drei Tage lang eine Elektrolytbilanzdiät mit 120 - 140 mval NaCl/die und 60 bis 80 mval KCl/die. Im Anschluß daran erfolgte eine dreitägige Salzrestriktion mit 10 mval NaCl/die bei unverändertem KCl. Die Natriumausscheidung wurde durch einmalige Gabe von 40 mg Furosemid am ersten Tag der Salzrestriktion beschleunigt.

Am letzten Tag beider Diätformen wurde nach mindestens acht Stunden strenger Bettruhe arterielles Blut der arteria brachialis und venöses der Cubitalvene entnommen. Die arterielle und venöse Blutentnahme erfolgte simultan. An die Funktionskanülen wurden sterile Polyvinylchloridschläuche angesetzt und in ein Eis-Wasser-Bad geleitet; hier wurde das durch die Schläuche laufende Blut momentan auf 0°C abgekühlt, wodurch die im Plasma befindlichen Enzyme in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt wurden. Die Blutproben wurden in Einmalspritzen, die für 15 ml Blut 0,5 ml einer Lösung von 0,1 mol/l Na₂EDTA und 0,05 mol/l o-Phenanthrolin zur Hemmung der Angiotensinase- und converting enzyme Aktivität enthielten, aufgenommen.

Nach Abnahme von jeweils 15 ml Blut wurden die Spritzen zur Vermeidung der Gerinnung des Blutes gut durchmischt. Es wurde sofort in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 2 000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bis zur Aufarbeitung bei -18°C aufbewahrt.

III.5. Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus Plasma

III.5.1. Extraktion mit Fullers Erde

Nach dem Verfahren von Boyd et al.(12) wurden 100 mg Fullers Erde mit 6 ml Plasma bei 4°C versetzt und unter Rotation des Ansatzgefes eine Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Plasma vom Sediment abgesaugt und verworfen. Die Fullers Erde wurde anschließend 3-mal mit 5 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Elution der Oligopeptide erfolgte mit Ammoniak und Methanol (9 : 1).

III.5.2.Extraktion mit Amberlite IRC 50

400 mg Amberlite IRC 50 in der H⁺-Form wurden mit 6,0 ml frisch zentrifugiertem Plasma versetzt und eine Stunde bei 4°C zur Bindung von Angiotensin und seinen Metaboliten durchmischt. Das Inkubationsgemisch wurde über eine Glasfritte gegeben, deren Porengröße so beschaffen war, daß die Bestandteile des Plasmas frei passieren konnten, während der Ionenaustauscher zurückgehalten wurde. Nach der Waschung des Ionenaustauschers mit fünf mal fünf ml Wasser und zwei mal fünf ml Methanol erfolgte die Elution der adsorbierten Oligopeptide mit zwei mal zwei ml einer Lösung von konzentriertem Ammoniak und Methanol (9 : 1). Das Eluat wurde in kleinen Kunststoffröhrchen aufgefangen und bei 37°C über einem Luftstrom zur Trockne eingeengt.

III.5.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2

III.5.3.1. Verwendung von nicht gewaschenem Dowex

400 mg Dowex 50W-X2 in der H⁺-Form wurden mit 6,0 ml Plasma

versetzt ohne vorherige Reinigung des Ionenaustauschers.

III.5.3.2. Verwendung von gewaschenem Dowex

Vor Verwendung des Ionenaustauschers Dowex 50W-X2 zur Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus dem Plasma wurde er jeweils im Turnus von 12 Stunden mit 4 normaler Natronlauge, bidestilliertem Wasser, 25%igem Ammoniak, bidestilliertem Wasser, 2 normaler Salzsäure und bidestilliertem Wasser gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde über den Zeitraum von mindestens einer Woche durchgeführt, bevor der gereinigte Ionenaustauscher eingesetzt wurde. Am Ende der Waschung lag Dowex in der H^+ -Form vor. Für die Extraktion der Oligopeptide aus 6,0 ml Plasma wurde 1,0 ml Dowex, was ca. 400 mg entspricht, eingesetzt. Die Adsorption der Oligopeptide an den Ionenaustauscher erfolgte, wie bei dem Versuchsansatz mit Amberlite beschrieben, während einer einstündigen Durchmischung bei 4°C. Anschließend wurde der Ionenaustauscher mit Wasser und Methanol gewaschen. Die Elution von Angiotensin II und seinen Metaboliten erfolgte ebenfalls durch zweimalige Behandlung mit je 2 ml konzentriertem Ammoniak und Methanol (9 : 1).

III.6. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

III.6.1. Elektrofokussierung

III.6.1.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten

Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden nach dem Verfahren der Elektrofokussierung fraktioniert. Zur Anwendung kam eine LKB 110 ml Säule mit einer 1%igen Konzentration des Ampholine Träger Ampholyten pH drei bis zehn in einem Saccharose Dichtegradienten. Der zentrale Elektrodenabschnitt enthielt die Kathodenlösung (14 g Saccharose, 12 ml Wasser, 0,4 ml Aethylendiamin). Die Säule wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers zur Herstellung eines Dichtegradienten gefüllt, der folgende Lösungen enthielt:

- a. Dichte Lösung: 28 g Saccharose, 25 ml wasser, 1,88 ml 40%ige Ampholine pH drei bis zehn.
- b. Leichte Lösung: 59 ml Wasser, 0,63 ml 40%ige Ampholine pH drei bis zehn.
- Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II oder Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurde vor Füllung der Säule der leichten Lösung zugesetzt. Der Gradient wurde mit der Anodenlösung (0,1 ml Schwefelsäure, 10,0 ml Wasser) überschichtet. Der Fokussierungsversuch erfolgte 36 Stunden lang bei 5°C. Die Endspannung betrug 600 Volt, die Stromstärke 0,3 mA. Die Säule wurde dann mit Hilfe einer Vario-Perpex Pumpe (LKB 1200) mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min entleert, wobei 3 ml Fraktionen in einem gekühlten Fraktionssammler aufgefangen wurden. Die Messung der Absorption erfolgte mit einem Durchfluß Photometer Uvicord II 8300A, die pH-Messung einer jeden Probe bei 0°C mit dem Digital pH-Meter der Firma Orion. Alle Fraktionen wurden mit 0,1 n NaOH oder 0,1 n HCl auf pH 7,0 eingestellt und anschließend radioimmunologisch auf ihren Gehalt an Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid untersucht.

III.6.1.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel

Zur Dünnschichtelektrofokussierung im Polyacrylamidgel wurde das LKB 2117 Multiphor-Gerät verwendet. Zur Polymerisation des Gels wurde eine frisch evakuierte Lösung von 10,0 ml 29,1%igem Acrylamid, 10,0 ml 0,9%igem NN'-Methylenbisacrylamid, 36,6 ml 5%iger Rohrzuckerlösung, 1,5 ml Ampholine pH 5 - 7, 1,5 ml Ampholine pH 7 - 9 und 0,8 ml 1%iger Kaliumperoxodisulfatlösung zwischen zwei in einem Abstand von 2,5 mm parallel und senkrecht stehende, mit einem Dichtungsring abgedichtete 20 mal 15 cm große Glasplatten gegossen. Nach Beendigung der Polymerisation, die ca. eine Stunde in Anspruch nahm, wurde die Deckplatte von dem Gel entfernt und dieses mit der Bodenplatte in der Elektrofokussierkammer auf einer von Kühlspiralen durchzogenen Platte installiert. Als Anode diente ein in 1 molarer

Phosphorsäure und als Kathode ein in 1 molarer Natronlauge getränkter 0,5 cm breiter und 2 mm dicker Papierstreifen. Die Elektroden wurden direkt auf das Gel aufgelegt und über einen Platindraht mit der Spannungsquelle verbunden. Die zu trennenden Proben wurden in gelöster Form auf einen 3 mm breiten und 10 mm langen Chromatographiepapierstreifen Whatman 3 MC aufgetragen, der noch feucht auf das Polyacrylamid zwischen den beiden Elektroden aufgelegt wurde. Die eigentliche Elektrofokussierung dauerte im Durchschnitt 16 Stunden; die Spannung wurde während des Laufs stufenweise von 300 Volt auf 600 Volt gesteigert. Um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden, wurde das Gel mit einem Kryostaten von unten her gekühlt. Nach Beendigung der Elektrofokussierung wurde das Polyacrylamid in 1 cm breite Streifen zerteilt und mit 2 ml Wasser eluiert. Nach Messung der pH-Werte der Eluate wurden diese mit 0,1 n Natronlauge bzw. 0,1 n Salzsäure neutralisiert und auf ihren Gehalt an radioimmunologisch aktiven Oligopeptiden untersucht.

III.6.2. Chromatographische Verfahren

III.6.2.1. Papierchromatographie

III.6.2.1.1. Trennung von ^{125}J -Angiotensin II und ^{125}J -Angiotensin II-(2-8)-hexapeptid

Die beiden radioaktiv markierten Oligopeptide wurden 4 cm vom unteren Rand auf Whatman 3 MC Chromatographiepapier, 50 mal 20 cm, aufgetragen. Als Fließmittel diente n-Butanol - Acetessigsäureäthylester - Wasser - Essigsäure (30 : 30 : 15 : 3). Zunächst wurde die Chromatographiekammer mit Filtrierpapier ausgelegt, das mit Fließmittel befeuchtet war. Nach Sättigung der Kammer wurde in einem temperierten Raum bei 20°C über 16 Stunden aufsteigend chromatographiert. Nach Trocknung des Chromatogramms wurde dieses in 1 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Gamma Counter Tracerlab zur Lokalisation und Bestimmung der Rf-Werte der beiden Oligopeptide gezählt.

III.6.2.1.2. Trennung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

Die Auftragung und die chromatographische Trennung der Oligopeptide erfolgte wie unter III.6.2.1.1. beschrieben, wobei die einzelnen Auftragstellen 12 cm auseinander lagen. Zur Lokalisation der Oligopeptide wurde das Chromatogramm nach Entwicklung und Trocknung bezüglich der Laufrichtung in 1,0 cm breite und 8,0 cm lange Streifen geschnitten, die an einer Schmalseite schräg zugeschnitten wurden. Die Streifen wurden mit der nicht abgeschrägten Seite zwischen zwei Objektträger eingespannt und mit Wasser eluiert, wobei das Eluat kontinuierlich von der Spitze des Streifens abtropfte und in Kunststoffröhrchen mit 4,0 ml Volumen aufgefangen wurde. Zur Vermeidung der Austrocknung der Papierstreifen während der Elution erfolgte diese in einer mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegten verschlossenen Kammer. Nach Trocknung der Eluate über einem Luftstrom bei 37°C wurden diese radioimmunologisch bestimmt.

III.6.2.2. Dünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung der Rf-Werte von Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden diese auf Silicagel Dünnschichtchromatographieplatten (Merck 7521, 20 mal 20 cm) drei cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen. Die aufsteigende Chromatographie erfolgte in einem mit Filtrierpapier ausgelegten und Fließmittel gesättigtem Chromatographiebehälter bei 24°C; als Fließmittel diente n-Butanol - Essigsäure - Wasser - Acetessigsäureäthylester (30 : 3 : 15 : 30). Das Chromatogramm wurde über sechs Stunden aufsteigend entwickelt, über Nacht im Trockenschrank bei 40°C getrocknet und in 0,5 cm breite Streifen unterteilt. Die einzelnen Sektionen wurden mit Hilfe eines Spatels von der Glasplatte gelöst und in Membranfilterfritten überführt. Die Elution erfolgte mit 2 mal 2 ml

konzentriertem Ammoniak - Methanol Gemisch (9 : 1). Nach Trocknung wurden die Fraktionen in 0,2 ml Wasser gelöst und radioimmunologisch bestimmt.

III.7. Bestimmung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid aus Plasma

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden die getrockneten Eluate von Dowex 50W-X2 in drei mal 100 µl Wasser gelöst und quantitativ auf Silicagel Dünnschichtchromatographieplatten übertragen. Zur Beschleunigung der Trocknung während des Auftragens wurden die Auftragstellen mit einem Föhn getrocknet. Es wurde darauf geachtet, daß der Durchmesser nicht größer als 0,5 cm war. Nach der Entwicklung und Trocknung des Chromatogramms wurde das Kieselgel mit Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid bezüglich der vorher ermittelten Rf-Werte von der Dünnschichtplatte abgekratzt und mit 2 mal 2 ml Ammoniak - Methanol Gemisch (9 : 1) über Glasfilterfritten eluiert. Daran schloß sich die radioimmunologische Bestimmung an.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden in getrennten Ansätzen die beiden Oligopeptide in steigenden Konzentrationen zu je 6,0 ml eines einheitlichen menschlichen Plasmas zugesetzt. Die Adsorption wurde bei 4°C mit 400 mg Dowex 50W-X2 durch Rotation des Inkubationsansatzes über eine Stunde durchgeführt. Der Ionenaustauscher wurde über einer Glasfilterfritte vom Plasma befreit, mit Wasser und Methanol gewaschen und mit 2 mal 2 ml Ammoniak - Methanol Gemisch eluiert. Die getrockneten Eluate wurden in 3 mal 100 µl Wasser aufgenommen, auf Silicagelchromatographieplatten übertragen und aufsteigend chromatographiert. Das Chromatogramm wurde bezüglich der Rf-Werte für Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid eluiert und radioimmunologisch ausgewertet.

IV. E R G E B N I S S E

IV.1. Angiotensin II-Antiserum

20 weisse Neu-Seeland Kaninchen wurden mit Asn¹-Val⁵-Angiotensin II immunisiert, das mit Carbodiimid an Kaninchen-Serum-Albumin gekoppelt war. Vor Beginn der Immunisierung konnte bei keinem der Versuchstiere Antiserum gegen Angiotensin II nachgewiesen werden. Von der dritten Boosterinjektion an wurde der Verlauf des Titers regelmäßig kontrolliert. Acht Tiere starben im Laufe des Verfahrens. Mit einer Ausnahme bildeten alle überlebenden Kaninchen gegen Angiotensin II gerichtete Antikörper in unterschiedlichem Titer, jedoch mit ähnlicher Affinität zu dem Antigen wie die annähernd parallelen Titrationskurven zeigen. Als Titer wird hierbei die Antiserumverdünnung bezeichnet, bei der in Abwesenheit von nicht markiertem Angiotensin II 50% des zugesetzten ¹²⁵J-Asn¹-Val⁵-Angiotensin II (5 000 cpm) an den Antikörper gebunden sind. Bemerkenswert war, daß während der zahlreichen Boosterinjektionen bei allen Kaninchen, die Antikörper bildeten, der Titer keine einheitliche Tendenz zeigte, sondern starken Schwankungen unterworfen war. Tabelle 1. enthält von der dritten Boosterung an die Titer der einzelnen Antiseren. In der letzten Spalte der Tabelle sind die Antiserumtiter zum Zeitpunkt der Entblutung angeführt; Abb.1 zeigt zu dem gleichen Zeitpunkt die Titrationskurven der Antiseren mit 5 000 cpm ¹²⁵J-Asn¹-Val⁵-Angiotensin II zur Titerbestimmung. Alle Tiere bis auf Kaninchen Nr. 13 hatten Anti-Angiotensin II gebildet. Die Titer der übrigen Seren lagen zwischen 170 und 62 000.

Die Überprüfung der Spezifität der Antiseren ergab, daß alle mit den getesteten niedermolekularen Angiotensin-Analogen eine ausgeprägte Kreuzreaktion zeigten, jedoch kaum mit dem höhermolekularen Angiotensin I und dem synthetischen Angiotensin II-Antagonisten Sar¹-Ala⁸-Angiotensin II reagierten.

Datum	11.3.	5.4.	26.4.	11.5.	4.6.	20.6.	12.7.	3.8.	10.9.	18.10.	27.10.
Tier	Titer										
1	-	-	-	25	256	4000	6000				
2	-	-	64	500	1000	4000	1500	2000	1000	256	2700
3	-										
4	-										
5	220	9000	1000	1500	8000	10000	16000	16000	10000	2000	5400
6	55	512	1000								
7	8	5000	4000	256	1000	2000	4000	1000	600	256	1700
8	-	-	16	32	2000	7000	256	500	256	128	16400
9	-	-	200	200	500	800	1500	3000	1000		
10	10	35000	16000	1000	4000	8000	4000	4000	3000	512	12500
11	-	9000	4000	1000	4000	64	64	64	2000	60	4600
12	17	60000	20000	2000	16000	16000	20000	32000	16000	2048	17500
13	-										
14	240	70000	32000	8000	32000	16000	30000	40000	40000	10000	62000
15	24	10000	10000	2000	12000	8000	8000	32000	8000	2000	1500
16	-	5000	32000	2000	4000	8000	8000	16000	20000	700	
17	-	10000	8000	100	500	500	200	150	100	64	170
18	124	60000	6000								
19	33	60000									
20	-	55000	30000	4000	16000	30000	10000	20000	5000	3000	42000

Tab. 1:
Verlauf des
Titer
während der
Immunisierung

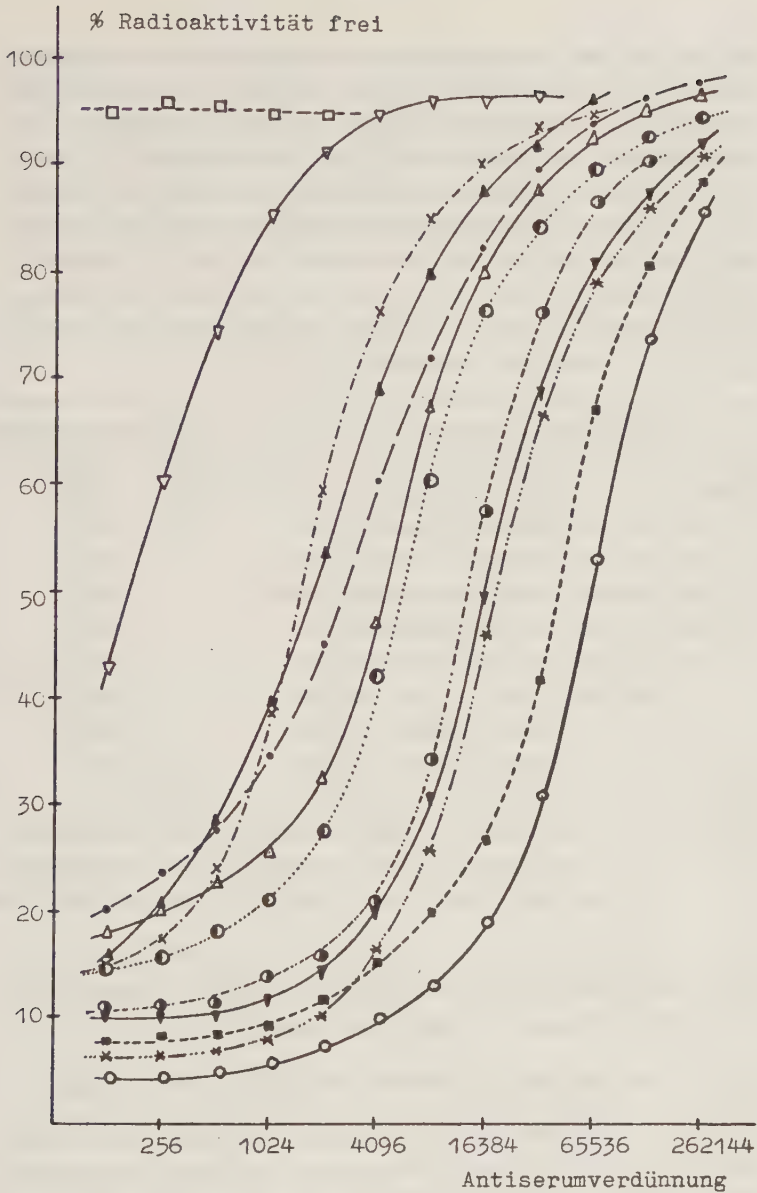


Abb. 1: Titrationskurven der Antiseren mit 5 000 cpm ^{125}J -Asn¹-Val⁵-Angiotensin II in einem Inkubationsvolumen von 0,3 ml bei pH 7,5.

Für den bei den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Antikörper von Kaninchen Nr. 14 ist der Prozentsatz der Kreuzreaktion auf molarer Basis in Tab.2 angegeben. Als Bezugsstandard wurde α -L-Asn¹-Val⁵-Angiotensin II verwendet, das zur Immunisierung eingesetzt wurde. Da die Titrationskurven der verschiedenen Oligopeptide parallel verliefen, erfolgte die Auswertung bei fünf bis sieben Verdünnungen im steilen Bereich der Titrationskurven. In Abb.2 sind von einem Teil der getesteten Oligopeptide die Titrationskurven dargestellt.

Angiotensin Analoge	Kreuzreaktion in %
α -L-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu	0,48
α -L-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	99,6
β -L-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	99,1
α -L-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	100,6
α -D-Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	93,1
Sar-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala	0,02
Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	65,7
Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe	102,0
Tyr-Ile-His-Pro-Phe	94,6

Tab.2: Kreuzreaktion des gegen α -L-Asn¹-Val⁵-Angiotensin II gerichteten Antiserums von Kaninchen Nr.14 mit einigen Angiotensin Analogen auf molarer Basis

IV.2. Markierung von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid mit ¹²⁵J

IV.2.1. Überprüfung der Reaktionsausbeute für ¹²⁵J:

Zur Beurteilung der Reaktionsausbeute eignet sich nach Jodination die Papierelektrophorese des Reaktionsgemisches bei pH 8,6, da diese die Trennung des markierten Angiotensin II von den markierten Fragmenten des Angiotensin II

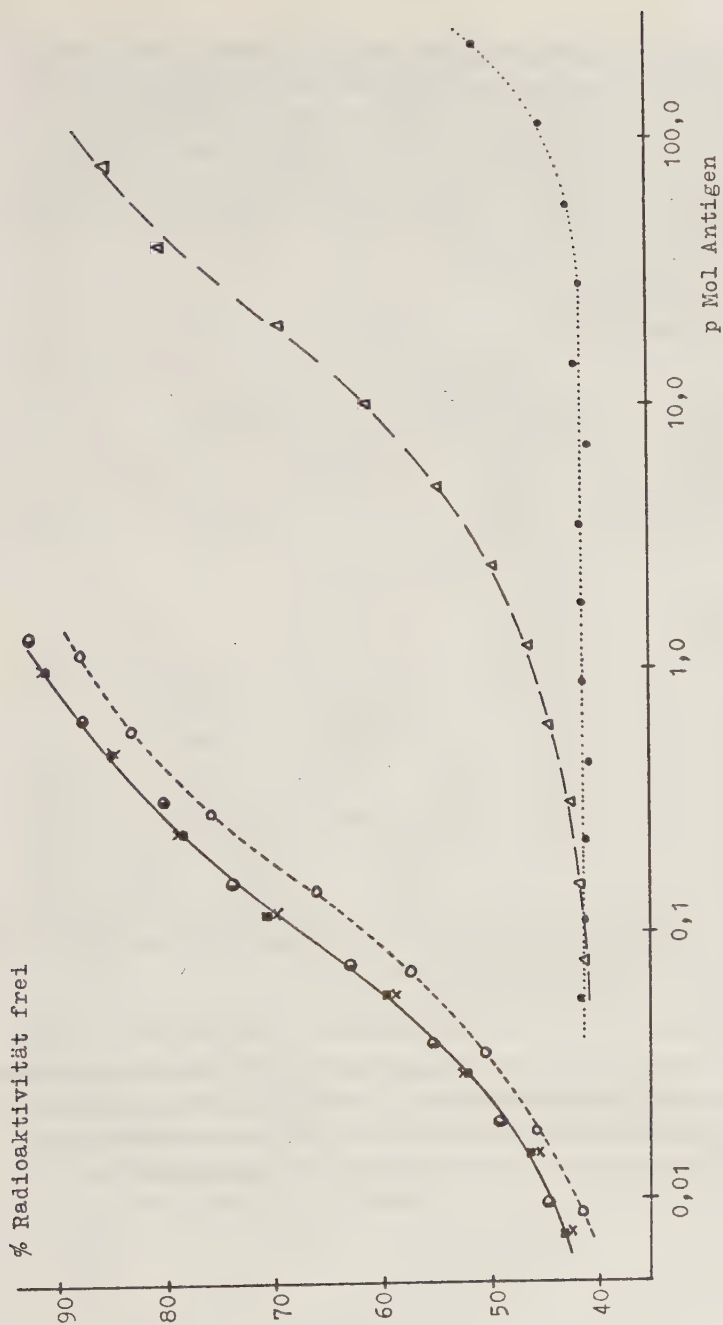


Abb.2: Kreuzreaktion von Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II (■), Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (●), Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid (○), Angiotensin I (Δ) und Sar⁸-Ala⁸-Angiotensin II (○) mit einem gegen Asn¹-Val⁵-Angiotensin II (*) gerichteten Antiserum

(Damage) und nicht umgesetztem $^{125}\text{J}^-$ ermöglicht. Abb.3 zeigt ein typisches Elektropherogramm des Reaktionsgemisches. 91,2% der Radioaktivität erscheinen in dem $^{125}\text{J}\text{-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ - Peak, 6,45% liegen als nicht umgesetztes $^{125}\text{J}^-$ vor und die restlichen 2,35% der Radioaktivität entsprechen den markierten Fragmenten des Angiotensins.

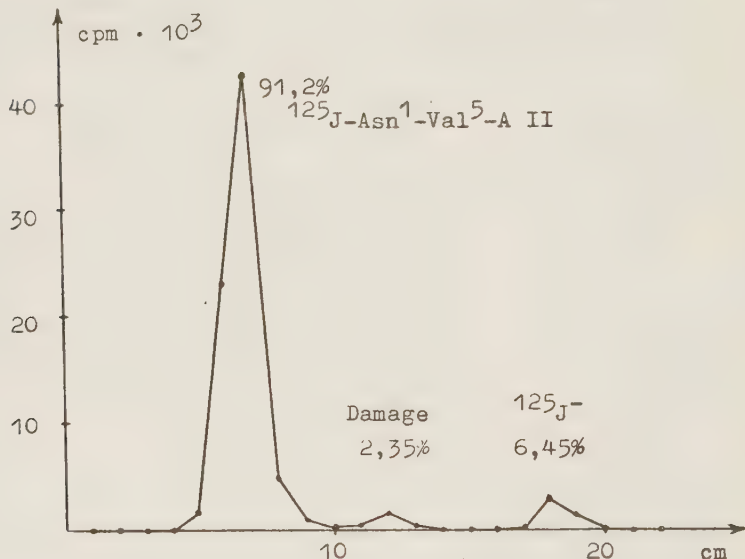


Abb.3: Papierelektrophorese bei pH 8,6 zur Berechnung der Reaktionsausbeute bei der Markierung von $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ mit ^{125}J .

Bei der Radiojodierung von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden quantitativ annähernd gleiche Ergebnisse erzielt wie bei $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$. Die Reaktionsausbeute für ^{125}J lag auch beim Hexapeptid bei annähernd 90%.

IV.2.2. Reinigung der radiojodierten Antigene

Das Reaktionsgemisch der Jodination von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurde mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie über DEAE Sephadex A-25 fraktioniert. Bei der Messung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurden zwei vollständig voneinander getrennte Peaks erhalten. Abb.4 zeigt am Beispiel von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II den Verlauf der Elution. Im Radioimmunoassay zeigte nur der zuerst eluierte Peak eine antigene Wirkung gegenüber Angiotensin II-Antiserum; er entsprach somit dem radiojodierten Hormon. Papierelektrophoretisch wanderte die Radioaktivität des zweiten Peaks so schnell wie ein ¹²⁵J⁻-Standard. Die Radioaktivität dieses Peaks entsprach dem nicht umgesetzten Jodid.

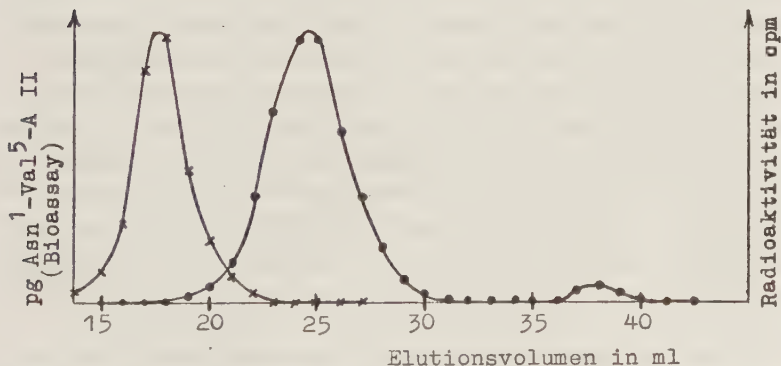


Abb.4: Trennung des nicht markierten (*) vom radiojodierten Asn¹-Val⁵-Angiotensin II (•) und nicht umgesetzten ¹²⁵J⁻ über eine Sephadex DEAE A-25 Säule. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gamma Counter Tracerlab und die des nicht markierten Oktapeptids im Bioassay.

Die Messung der Konzentration von nicht radiojodiertem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II in den einzelnen Fraktionen erfolgte im Bioassay über die blutige Blutdruckmessung an der Ratte. Es zeigte sich, daß das nicht markierte Okta-peptid früher als sein radiojodiertes Homologes von der Sephadexsäule eluiert wurde und von diesem fast vollständig abgetrennt war (Abb.4).

Da Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid im Bioassay keine Blut-druckwirksamkeit zeigt, konnte die Abtrennung des markierten Hexapeptids von seinem nicht radiojodierten Homologen am Blutdruck der Ratte nicht kontrolliert werden. Infolge der hohen Radioaktivität der Eluate von der Sephadexsäule mußte für die radioimmunologische Verwendung das markierte Antigen so stark verdünnt werden, daß geringe Konzentrationen von nicht markiertem Antigen ohnehin die Genauigkeit des Radioimmunoassays kaum beeinflußt hätten.

Zur Überprüfung der Einheitlichkeit der Fraktionen mit einer hohen Konzentration an radiojodiertem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bei fehlendem kalten Angiotensin II bzw. an ¹²⁵J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden 0,1 ml der verdünnten Eluate der Sephadexsäule papierelektrophoretisch getrennt. Die Fraktionen im Maximum der Radioaktivität zeigten hierbei einen einheitlichen Peak und die später eluierten Fraktionen ergaben neben einem hohen noch einen zweiten kleinen Peak, der dem Damage entsprach.

Für den Radioimmunoassay wurden prinzipiell nur solche Fraktionen verwendet, die frei von nicht markiertem Angiotensin II und Damage waren. Obwohl die Halbwertszeit von ¹²⁵J nur 60 Tage beträgt, konnte das markierte Hormon bis zu drei Monaten verwendet werden, ohne daß die Genauigkeit und die Empfindlichkeit der Methode darunter gelitten hätten.

IV.3. Radioimmunoassay von Angiotensin und seinen Analogen

IV.3.1. Einfluß von $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$

In Vorversuchen erwies es sich als günstig, bei der radioimmunologischen Bestimmung von Angiotensin II den einzelnen Proben eine Gesamtradioaktivität von ca. 5 000 cpm $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ zuzusetzen. Mit geringen Mengen markierten Antigens im Reaktionsansatz war die Empfindlichkeit der Methode hoch; setzte man jedoch zu geringe Mengen zu, so war die in der Probe enthaltene Radioaktivität so niedrig, daß sich die radioaktive Fremdeinstrahlung, der Background, störend bemerkbar machte.

IV.3.2. Einfluß von Antiserum

Die zu verwendende Antiserumkonzentration wurde im wesentlichen von der Konzentration des radioaktiv markierten Antigens bestimmt; die Antiserumkonzentration wurde so gewählt, daß in Abwesenheit von nicht markiertem Angiotensin II zwischen 65 und 85% des als Label verwendeten $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ vom Antikörper gebunden wurden (Abb.5). Bei dem verwendeten Antiserum von Kaninchen Nr.14 erwies sich eine Antiserumverdünnung von 1 : 16 000 als günstig. In dem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 0,45 ml betrug die Antiserumverdünnung somit 1 : 36 000. Unter Verwendung von 5 000 cpm $^{125}\text{J-Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ wurden Standardkurven mit den Antiserumverdünnungen 1 : 2 000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 16 000, 1 : 32 000, 1 : 64 000 und 1 : 128 000 aufgenommen (Abb.5). Die Standardkurven mit hohen Antiserumkonzentrationen verliefen steiler als diejenigen mit niedrigen Antikörperkonzentrationen und erhöhten somit die Empfindlichkeit der Methode in dem steilen Bereich der Kurve. Niedrige Antiserumkonzentrationen ergaben flachere Standardkurven, waren aber zu tieferen Konzentrationen des kalten Antigens hin verschoben und ermöglichten somit die Bestimmung niedriger Konzentrationen des Hormons.

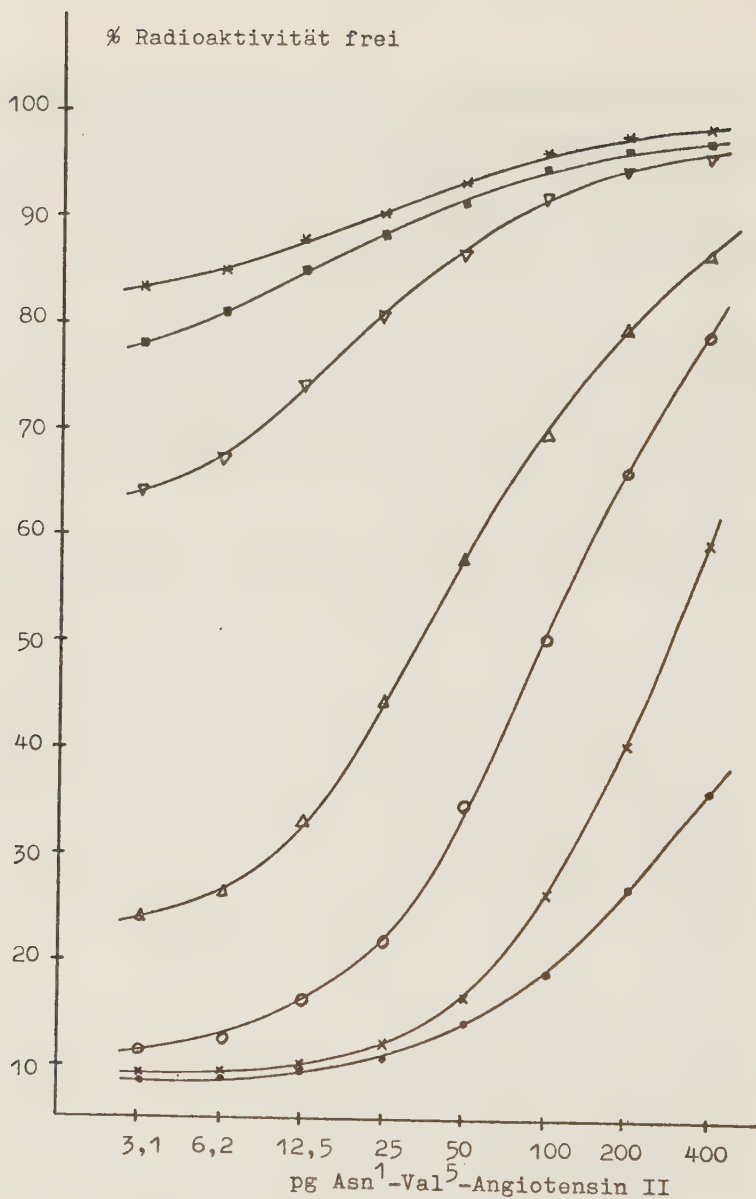
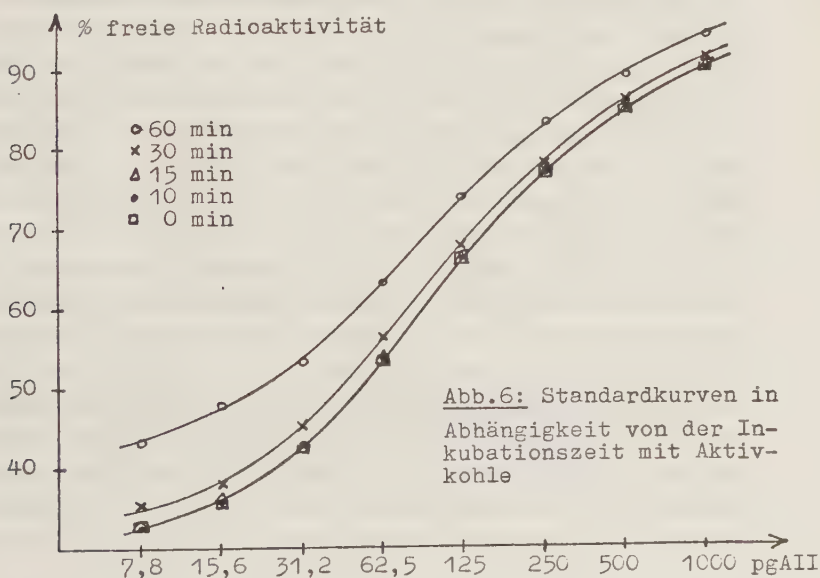


Abb. 5: Asn¹-Val⁵-Angiotensin II-Standardkurven mit unterschiedlichen Antiserumverdünnungen in Anwesenheit von 5000 cpm Label. • 1:2000, × 1:4000, ○ 1:8000, △ 1:16000, ▽ 1:32000, ■ 1:64000, * 1:128000

IV.3.3. Einfluß der Inkubationszeit mit Aktivkohle auf die Trennung des freien vom an den Antikörper gebundenen Antigen

Zur Trennung des freien von dem an den Antikörper gebundenen Antigen wurde der über Nacht praeinkubierte Reaktionsansatz von mehreren Standardkurven 60 min, 30 min, 15 min, 10 min, 5 min und 0 min vor Zentrifugation mit 1,0 ml der Aktivkohlesuspension bei 4°C versetzt. Aus Abb.6 ist ersichtlich, daß bis zu einer Zeit von 15 min die Standardkurven übereinstimmten. Wurde der Inkubationslösung jedoch 30 min oder sogar länger vor Beginn der Zentrifugation Aktivkohle zugegeben, so wurde an dieser eine deutlich höhere Radioaktivität gemessen. Bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden schließlich war annähernd die gesamte zugesetzte Radioaktivität an der Aktivkohle adsorbiert; daher wurde bei den späteren Untersuchungen prinzipiell unmittelbar nach Zugabe der Aktivkohle zu dem Reaktionsansatz zentrifugiert.



IV.4. Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus Plasma

IV.4.1 Extraktion mit Fullers Erde

6 ml frisch zentrifugierten menschlichen Plasmas wurden mit 100 mg Fullers Erde versetzt und nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren behandelt. Nach Elution der Oligopeptide von der Fullers Erde wurden diese radioimmunologisch bestimmt. Die Ergebnisse waren nur sehr schlecht reproduzierbar; daher wurde dieses Verfahren nicht als geeignet zur Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus dem Plasma angesehen.

IV.4.2 Extraktion mit Amberlite IRC-50

Das nach Extraktion von Plasma erhaltene Eluat von Amberlite IRC 50 wurde im Luftstrom getrocknet und radioimmunologisch bestimmt. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar. Zur Überprüfung der Bindungskapazität des Ionenaustauschers und der Recovery wurde einer einheitlichen Plasmaprobe $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ bzw. $\text{Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid}$ in steigenden Konzentrationen zugesetzt, mit 400 mg Amberlite IRC 50 extrahiert und radioimmunologisch bestimmt. Die dem Plasma zugesetzten Angiotensin II- bzw. Hexapeptidmengen lagen zwischen 50 und 4 000 pg. In Abb.7 und Abb.8 sind die Ergebnisse dargestellt. Mit statistischen Methoden wurde die Regressionsgerade für die Recovery von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid berechnet. Beachtenswert ist, daß selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von 4 000 pg exogen zugesetztem Oligopeptid die Geraden nicht von der Linearität abwichen. Hierdurch war gewährleistet, daß selbst bei sehr hohen Konzentrationen von Angiotensin II und seinem Metaboliten im Plasma die Menge des eingesetzten Ionenaustauschers ausreichend war, um die Oligopeptide zu binden. Für $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ wurde eine Recovery von 98,7 % und für Angioten-

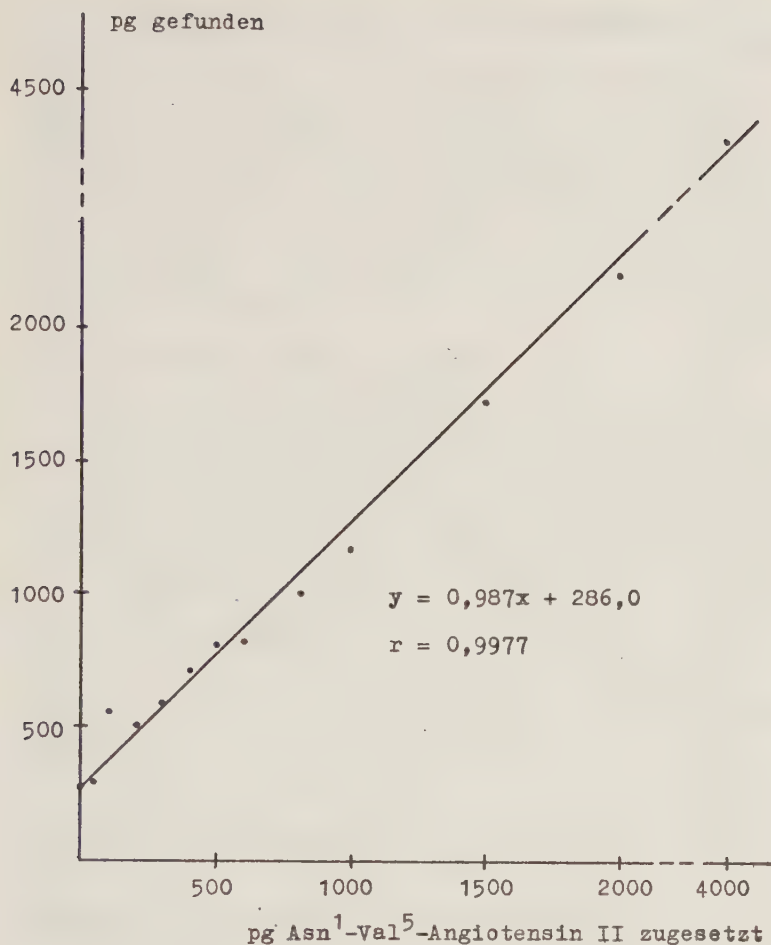


Abb.7: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II nach Extraktion mit Amberlite IRC-50

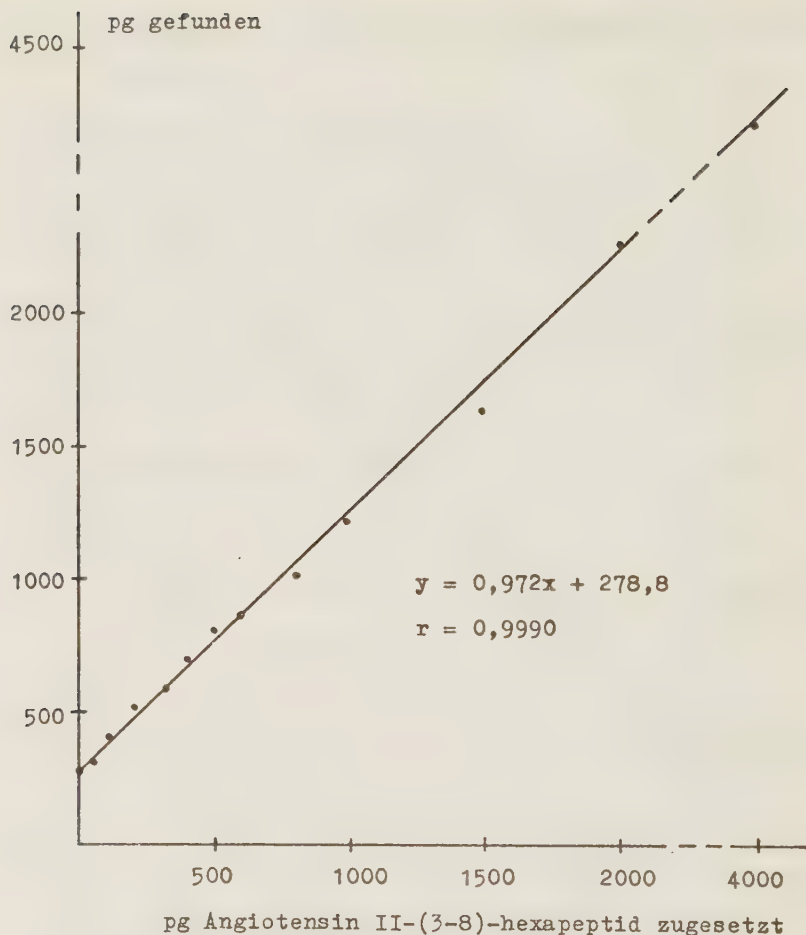


Abb.8: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid nach Extraktion mit Amberlite IRC-50

sin II-(3-8)-hexapeptid von 97,2 % berechnet.

Das ammoniakalische Eluat von Amberlite enthielt nach Trocknung einen den Radioimmunoassay nicht störenden Rückstand, der jedoch beim Übertragen auf Dünnschichtplatten einen ungleichmäßigen Lauf während der Chromatographie bedingte. Ist nach Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten deren dünn-schichtchromatographische Trennung erwünscht, muß von der Verwendung dieses Ionenaustauschers abgesehen werden.

IV.4.3. Extraktion mit Dowex 50W-X2

Bei wiederholter radioimmunologischer Bestimmung von Angiotensin II und seinen immunoreaktiven Metaboliten aus einem einheitlichen Plasma wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse gefunden. Wie in dem Abschnitt mit Amberlite beschrieben, wurde auch hier die Adsorptionskapazität des Ionenaustauschers und die Recovery durch Zugabe von exogenem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid überprüft. Auch hier wurde bis zu hohen Konzentrationen eine Linearität zwischen zugesetztem und radioimmunologisch bestimmtem immunoreaktivem Material festgestellt (Abb.9 und Abb.10). Die Recovery für Asn¹-Val⁵-Angiotensin II berechnete sich zu 86,8 % und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid zu 84,8 %. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war jedoch, daß Dowex nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren gereinigt wurde. Bei nicht ausreichend gewaschenem Ionenaustauscher wurden ausschließlich nicht reproduzierbare Ergebnisse gefunden. Aus dem ungereinigten Ionenaustauscher wurde immunoreaktives Material in hohen und variablen Konzentrationen eluiert, das bei der späteren radioimmunologischen Bestimmung Angiotensin vortäuschte. Nach Waschung des Ionenaustauschers waren jedoch keine immunoreaktiven Verunreinigungen mehr nachweisbar.

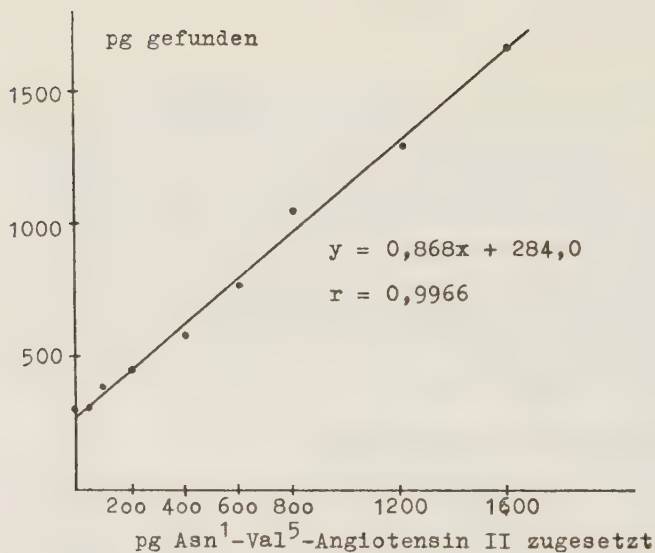


Abb. 9: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II nach Extraktion mit Dowex 50W-X2

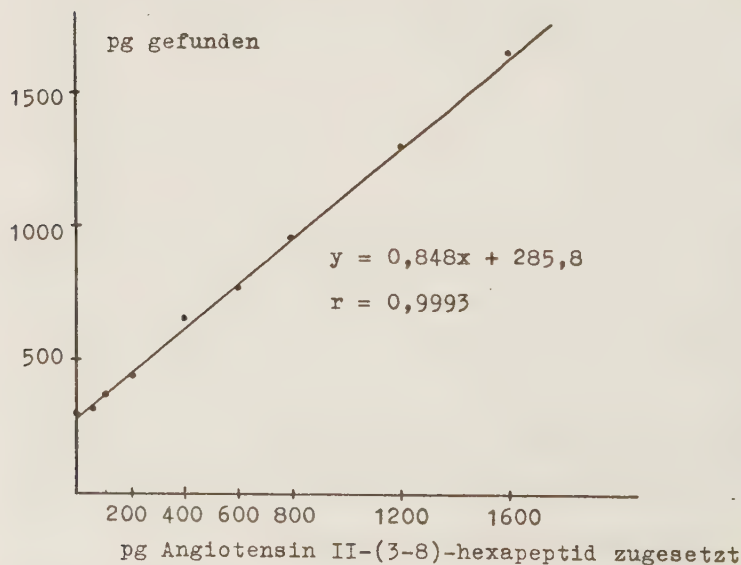


Abb. 10: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid nach Extraktion mit Dowex 50W-X2

IV.5. Trennung des Angiotensin II von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

IV.5.1. Elektrofokussierung im Dichtegradienten

0,1 mg Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. 0,1 mg Asp¹-Val⁵-Angiotensin II bzw. 0,1 mg Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden mit Hilfe der Elektrofokussierung im Dichtegradienten getrennt. Die Spannung betrug zu Beginn der Elektrofokussierung 300 Volt und wurde gegen Ende auf 600 Volt gesteigert. Der gesamte Versuch dauerte je nach verwendeten Ampholyten zwischen zwei und fünf Tagen. In Vorversuchen mit Ampholine pH drei bis zehn zeigte sich, daß die drei oben angegebenen Oligopeptide in dem pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,5 ihren isoelektrischen Punkt hatten, ohne sich jedoch scharf voneinander zu trennen. Bei Verwendung von Ampholine mit engerem pH-Bereich (pH 6-9, pH 7-9, pH 5-8) lagen die isoelektrischen Punkte von Asp¹-Val⁵-Angiotensin II (Abb.11) und von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (Abb.12) bei etwa pH 7,0; der isoelektrische Punkt von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II hingegen lag reproduzierbar bei Verwendung von Ampholine im pH-Bereich von 7-9 und von 5-8 bei etwa 7,9 (Abb.13). Eine vollständige Trennung der einzelnen Oligopeptide war jedoch nicht möglich, zumal die Peaks über mehrere Fraktionen verschmiert waren.

Die Bestimmung der Lokalisation der immunoreaktiven Oligopeptide erfolgte auf radioimmunologischem Wege. Nach Messung der pH-Werte der einzelnen Fraktionen der Säule wurde der pH-Wert mit 0,1 normaler Natronlauge oder 0,1 normaler Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Ampholine zu keiner Störung der radioimmunologischen Bestimmung von Angiotensin II führten und somit mit dem verwendeten Antikörper keine Kreuzreaktion zeigten.

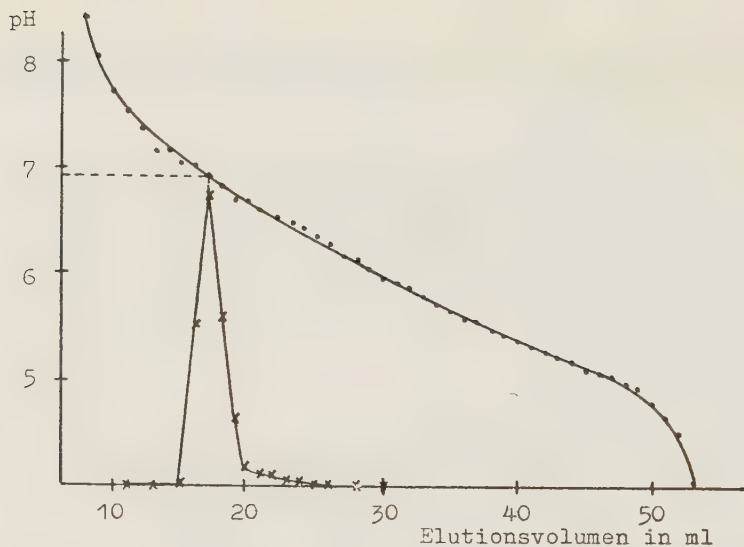


Abb.11: Elektrofokussierung von Asp¹-Val⁵-Angiotensin II
im Dichtegradienten mit Ampholine pH 5-8

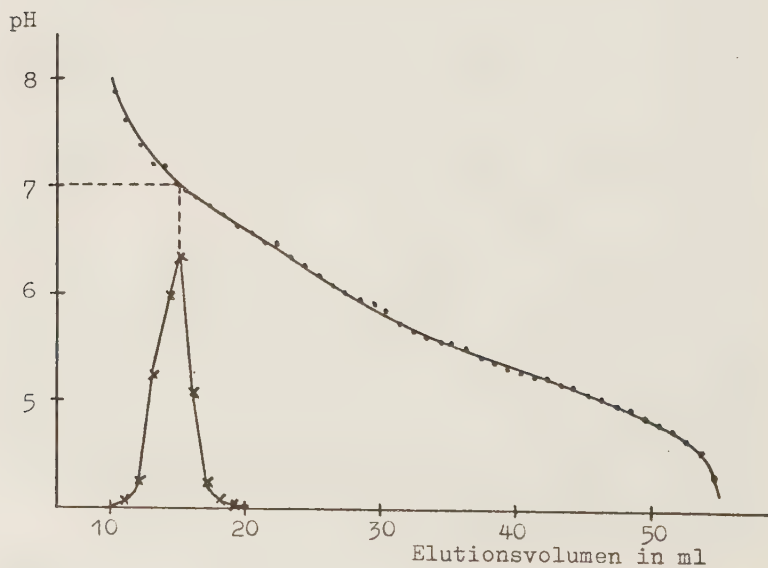


Abb.12: Elektrofokussierung von Angiotensin II-(3-8)-
hexapeptid im Dichtegradienten mit Ampholine
pH 5-8

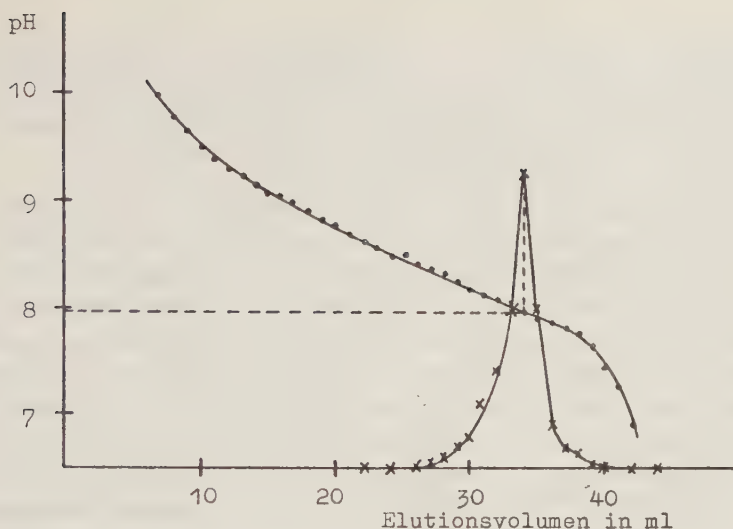


Abb.13.: Elektrofokussierung von $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ im Dichtegradienten mit Ampholine pH 7-9

IV.5.2. Elektrofokussierung im Polyacrylamidgel

0,1 mg $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ bzw. $\text{Asp}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden in einem 5%igen Polyacrylamidgel, das mit 0,15% NN'-Methylen-bisacrylamid quervernetzt war, mit 2% Ampholine im pH-Bereich 5-9 elektrofokussiert. Die isoelektrischen Punkte von $\text{Asp}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ (Abb.14) und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (Abb.15) lagen bei etwa pH 6,9 und unterschieden sich nicht voneinander. Der isoelektrische Punkt von $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ lag bei einem pH-Wert über 7,5 (Abb.16).

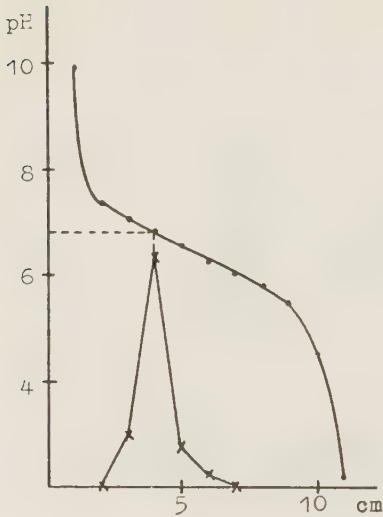


Abb.14: Elektrofokussierung
von Asp¹-Val⁵-A II
in Polyacrylamidgel
(Ampholine pH 5-9)

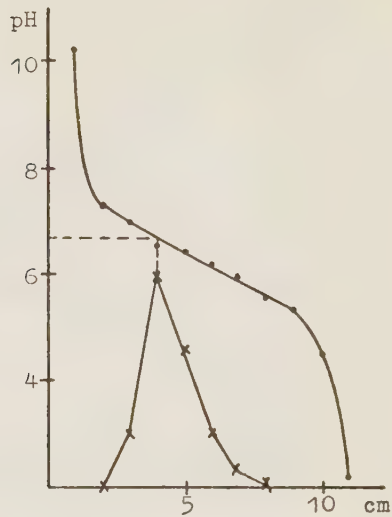


Abb.15: Elektrofokussierung
von Angiotensin II-
(3-8)-hexapeptid in
Polyacrylamidgel
(Ampholine pH 5-9)

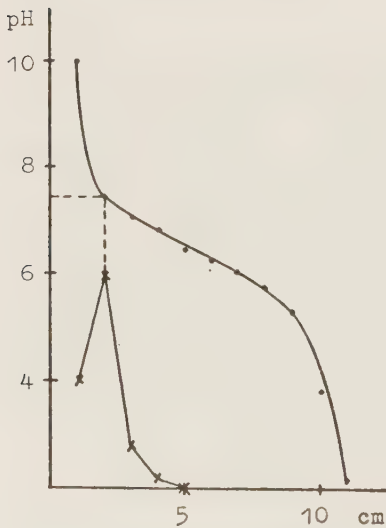


Abb.16: Elektrofokussierung
von Asn¹-Val⁵-A II
in Polyacrylamidgel
(Ampholine pH 5-9)

IV.5.3. Papierchromatographie

IV.5.3.1. Trennung von ^{125}J -Asn¹-Val⁵-Angiotensin II von ^{125}J -Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

^{125}J -Asn¹-Val⁵-Angiotensin II, ^{125}J -Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid sowie ein Gemisch der beiden radioaktiv markierten Oligopeptide wurden nach einem aufsteigenden Verfahren simultan mit n-Butanol - Acetessigsäureäthylester - Wasser - Essigsäure als Fließmittel papierchromatographisch getrennt. Abb.17 zeigt hierfür ein typisches Papierchromatogramm. Während das Oktapeptid in dem Chromatogramm von der Auftragstelle nur 13 cm wanderte und somit einen Rf-Wert von 0,29 hatte (Fließmittelfront 45 cm), wanderte das markierte Hexapeptid 37 cm und hatte somit einen Rf-Wert von 0,82.

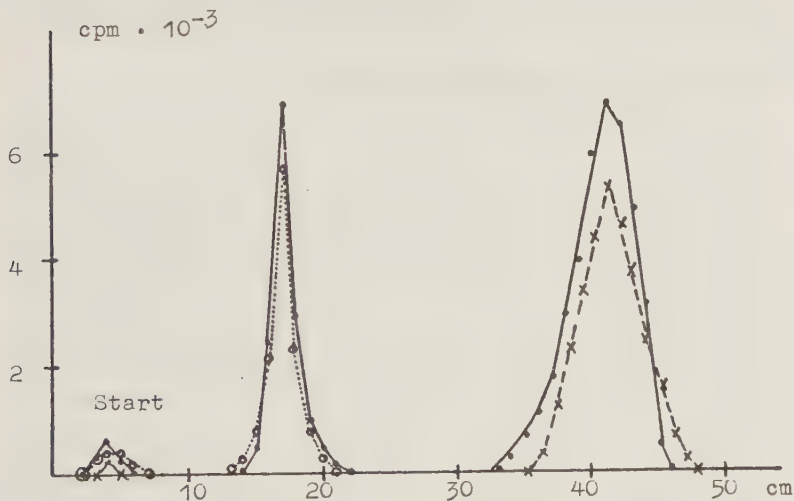


Abb.17: Papierchromatographie von ^{125}J -Asn¹-Val⁵-Angiotensin II (○—○), Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (radiojodiert) (×—×) und deren Gemisch (●—●) auf Whatman 3 MC Chromatographiepapier mit n-Butanol:Acetessigsäureäthylester:Wasser:Essigsäure (30:30:15:3) als Fließmittel

IV.5.3.2. Trennung von nicht radioaktiv markiertem Asn¹-Val⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

Asn¹-Val⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden papierchromatographisch getrennt und radioimmunologisch bestimmt. Es wurden keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt, da das verwendete Chromatographiepapier selbst radioimmunologisch aktive Substanzen enthielt, die ebenso wie Angiotensin aus dem Papier eluiert wurden und bei der radioimmunologischen Bestimmung Angiotensin II bzw. Hexapeptid vortäuschten. Dieser Background war nicht konstant und erreichte mitunter Konzentrationen, die um ein Vielfaches höher lagen als die in der Probe zu bestimmenden Angiotensinmengen. Auch durch vorherige Waschung des Chromatographiepapiers konnten diese immunoreaktiven Substanzen nicht vollständig eliminiert werden, sodaß von der Verwendung von Chromatographiepapier zur Trennung des Angiotensin II von seinen Metaboliten abgesehen wurde.

IV.5.4. Dünnschichtchromatographie

Asn¹-Val⁵-Angiotensin II, Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid wurden auf Silicagelplatten dünnschichtchromatographisch getrennt und radioimmunologisch bestimmt. Abb.18 zeigt ein typisches Chromatogramm. Der Rf-Wert von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II betrug ebenso wie derjenige von Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II 0,12 und der des Angiotensin II-(3-8)-hexapeptids 0,47. Aus dem Kieselgel selbst wurden keine Substanzen eluiert, die radioimmunologisch aktiv waren und somit die Bestimmung der Oligopeptide beeinflußt hätten.

Wurde Angiotensin II bzw Hexapeptid menschlichem Plasma zugesetzt, mit Dowex 50W-X2 extrahiert und die Dowex Eluate dünnschichtchromatographisch getrennt, so waren die Rf-Werte mit denen bei direkter Auftragung der Oligopeptide auf die Chromatographieplatte identisch.

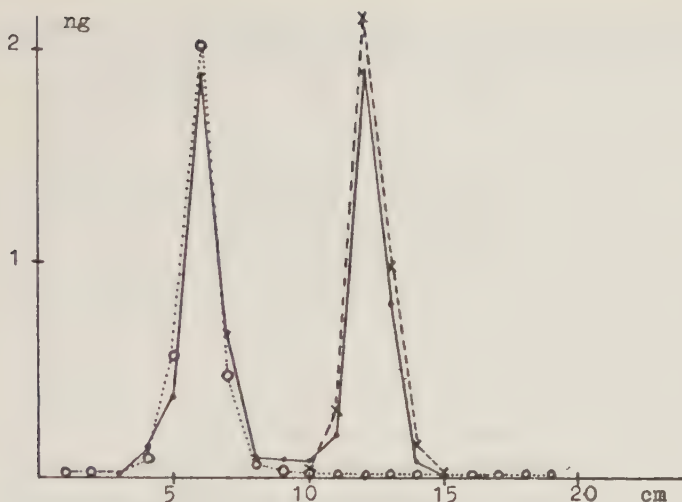


Abb.18: Dünnschichtchromatographie von Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II (○-○), Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (x-x) und deren Gemisch (●-●) auf Kieselgelplatten mit n-Butanol:Acetessigsäureäthylester:Wasser: Essigsäure (30:30:15:3) als Fließmittel

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid 6 ml eines einheitlichen menschlichen Plasmas in steigenden Konzentrationen zugesetzt, mit Dowex 50W-X2 aus dem Plasma extrahiert und die Eluate auf Kieselgelplatten übertragen. Nach der dünnschichtchromatographischen Trennung erfolgte bezüglich der vorher ermittelten Rf-Werte die Elution der getrennten Oligopeptide aus der Platte und deren radioimmunologische Bestimmung. Abb.19 und Abb.20 stellen die Ergebnisse dar. Für Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II wurde eine Recovery von 81,6% mit einem r-Wert von 0,9977 und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid eine Recovery von 77,2% mit einem r-Wert von 0,9992 ermittelt.

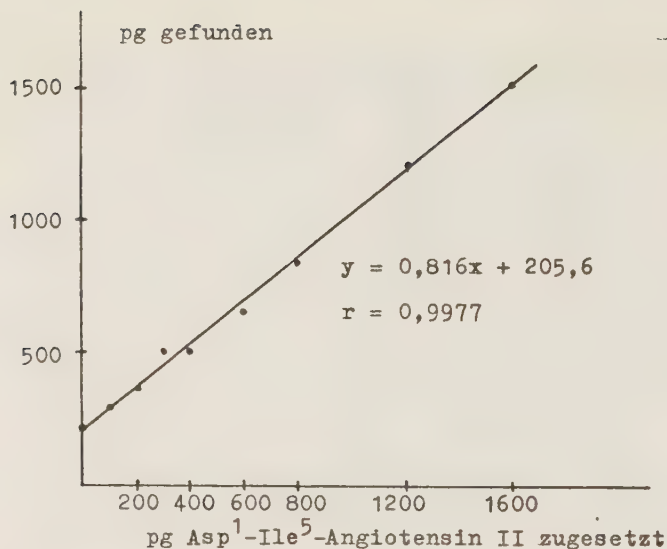


Abb.19: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II nach Extraktion mit Dowex 50W-X2 und anschließender Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatten.

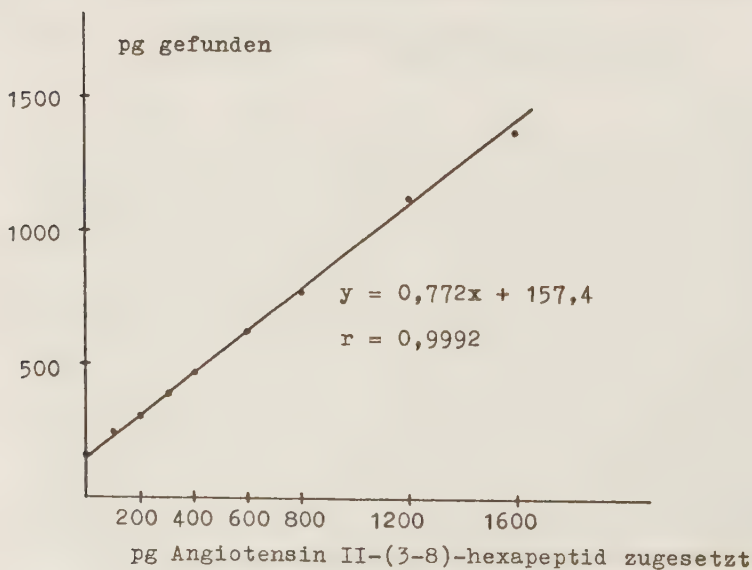


Abb.20: Lineare Beziehung zwischen Plasma zugesetztem und wiedergefundenem Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid nach Extraktion mit Dowex 50W-X2 und anschließender Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatten.

IV.6. Bestimmung der arteriellen und venösen Plasmakonzentrationen von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid

Bei fünf gesunden normotensiven Personen wurde vor und nach diätetischem Salzentzug endogenes Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren mit Dowex 50W-X2 aus arteriellem und venösem Plasma extrahiert. Die Oligopeptide wurden von dem Ionenaustauscher eluiert, über einem Luftstrom getrocknet und nach Lösung in drei mal 100 µl Wasser auf Dünnschichtkieselgelplatten übertragen. Nach der chromatographischen Auftrennung erfolgte die radioimmunologische Bestimmung. Tab.3 gibt die arteriellen und venösen Plasmakonzentrationen in Ruhe unter Elektrolytbilanzdiät (120 bis 140 mval NaCl/die und 60 mval KCl/die) und nach Salzentzug (10 mval NaCl/die, 60 mval KCl/die) wider.

Probanden	Angiotensin II- oktapeptid (pg/ml)		Angiotensin II- (3-8)-hexapeptid (pg/ml)	
	arteriell	venös	arteriell	venös
Schmitz	48,3	45,0	40,2	30,9
Mennichen	36,8	34,3	30,1	49,0
Becker	48,5	43,3	16,8	25,0
Heim	51,6	44,7	16,3	19,5
Holdefer	44,5	33,4	25,2	30,1

Tab.3a: Arterielle und venöse Angiotensin II- und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentrationen bei fünf normotensiven Probanden vor Salzentzug unter Elektrolytbilanzdiät

Probanden	Angiotensin II- oktapeptid (pg/ml)		Angiotensin II- (3-8)-hexapeptid (pg/ml)	
	arteriell	venös	arteriell	venös
Schmitz	77,8	58,7	54,0	52,6
Mennichen	66,4	53,3	43,9	70,7
Becker	113,2	82,4	45,7	50,2
Heim	76,2	62,7	24,8	36,9
Holdefer	90,9	84,5	58,3	55,6

Tab.3b: Arterielle und venöse Angiotensin II- und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentrationen bei fünf normotensiven Probanden nach Salzzentzug

Die in Tab.3a und 3b widergegebenen Werte sind bezüglich der Recovery von 81,6% für Angiotensin II und von 77,2% für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid korrigiert. Unter Elektrolytbilanzdiätbedingungen vor Salzzentzug betrug die mittlere Konzentration von Angiotensin II im arteriellen Plasma $45,94 \pm 5,70$ pg/ml, im venösen Plasma $40,14 \pm 5,79$ pg/ml. Die mittlere Konzentration von Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid lag im arteriellen Plasma bei $25,72 \pm 9,97$ pg/ml und im venösen Plasma bei $30,9 \pm 11,10$ pg/ml. Nach Salzzentzug lag die arterielle Angiotensin II-Konzentration bei $84,90 \pm 18,06$ pg/ml und die venöse bei $68,32 \pm 14,22$ pg/ml. Die arterielle Hexapeptidkonzentration war $45,34 \pm 12,91$ pg/ml und die venöse $53,20 \pm 12,11$ pg/ml (Tab.4).

	Angiotensin II- oktapeptid (pg/ml)		Angiotensin II- (3-8)-hexapeptid (pg/ml)	
	arteriell	venös	arteriell	venös
Vor Salzzentzug	45,94 ± 5,70	40,14 ± 5,79	25,72 ± 9,97	30,90 ± 11,10
nach Salzzentzug	84,90 ± 18,06	68,32 ± 14,22	45,34 ± 12,91	53,20 ± 12,11

Tab.4: Mittelwerte mit Standardabweichungen von Angiotensin II (n = 5) und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid (n = 5) vor und nach Salzzentzug

Vor Salzzentzug betrug das Verhältnis von arterieller zu venöser Plasmakonzentration von Angiotensin II $1,14 \pm 0,11 : 1$, entsprechend einer venösen Angiotensin II-Konzentration von $87,5 \pm 7,5\%$ des arteriellen Angiotensin II-Spiegels.

Das Verhältnis von arterieller zu venöser Plasmakonzentration des Hexapeptids betrug $0,85 \pm 0,27 : 1$, entsprechend einer venösen Hexapeptidkonzentration von $125,4 \pm 33,0\%$ des arteriellen Hexapeptidspiegels (Tab.5).

Unter Salzzentzug stieg die arterielle Angiotensin II-Konzentration von $45,94 \pm 5,70$ pg/ml auf $84,90 \pm 18,06$ pg/ml ($p < 0,01$) und die venöse von $40,14 \pm 5,79$ pg/ml auf $68,32 \pm 14,22$ pg/ml ($p < 0,01$). Das Verhältnis von arterieller zu venöser Angiotensin II-Konzentration betrug $1,25 \pm 0,11 : 1$, entsprechend einer venösen Angiotensin II-Konzentration von $80,7 \pm 7,7\%$ des arteriellen Angiotensin II-Spiegels. Der Anstieg des Verhältnisses von arterieller zu venöser Angiotensin II-Konzentration unter Salzzentzug war gegenüber den Ausgangsbedingungen nicht signifikant (Tab.5).

Unter Salzzug kam es zu einem Anstieg der arteriellen Hexapeptidkonzentration von $25,72 \pm 9,97$ pg/ml auf $45,34 \pm 12,91$ pg/ml ($p < 0,01$) und der venösen Hexapeptidkonzentration von $30,90 \pm 11,1$ pg/ml auf $53,2 \pm 12,11$ pg/ml ($p < 0,01$). Das Verhältnis von arterieller zu venöser Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration betrug $0,86 \pm 0,20 : 1$, entsprechend einer venösen Hexapeptidkonzentration von $125,5 \pm 30,4\%$ des arteriellen Hexapeptidspiegels (Tab.5). Salzzug führte zu keiner signifikanten Änderung des Verhältnisses zwischen arterieller und venöser Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration.

	Angiotensin II- oktapeptid	Angiotensin II- (3-8)-hexapeptid
Vor Salzzug	$1,14 \pm 0,11 : 1$ $87,5 \pm 7,5\%$	$0,85 \pm 0,27 : 1$ $125,4 \pm 33,0\%$
Nach Salzzug	$1,25 \pm 0,11 : 1$ $80,7 \pm 7,7\%$	$0,86 \pm 0,20 : 1$ $125,5 \pm 30,4$

Tab.5: Arteriovenöse Verhältnisse von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid vor und nach Salzzug sowie Prozentsatz der venösen von den arteriellen Oligopeptidkonzentrationen mit Standardabweichung

V. DISKUSSION

Es wird ein radioimmunologisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Angiotensin II und seinem wichtigsten immunoreaktiven Metaboliten Angiotensin II-(5-8)-hexapeptid aus menschlichem Plasma beschrieben.

Zunächst war es erforderlich einen gegen Angiotensin II bzw. Angiotensin II-(5-8)-hexapeptid gerichteten Antikörper zu gewinnen. Angiotensin II selbst hat infolge seines niedrigen Molekulargewichtes fast keine immunogenen Eigenschaften. Zwar gelang es unter Verwendung von Freund's Adjuvans gegen Angiotensin II gerichtete Antikörper zu erzeugen (32, 49, 87), jedoch waren die hierbei erzielten Titer nicht sehr hoch. Goodfriend et al. (42) entwickelten die Carbodiimidmethode zur Kopplung von Angiotensin an Proteine. Hierbei wirkt bei Immunisierung das an Eiweiß gekoppelte Angiotensin als Hapten. Die gegen diesen Komplex gerichteten Antikörper reagieren nicht ausschließlich mit diesem Komplex, sondern auch mit freiem Angiotensin (25, 35, 48). Boyd und Peart (14) adsorbierten Angiotensin II an Aktivkohle; auch dieser Komplex wirkte immunogen. Wir selbst konnten in nicht veröffentlichten Untersuchungen zeigen, daß nach Adsorption von Angiotensin I an Aktivkohle ein immunogen wirksamer Komplex gebildet wird, jedoch waren die erzielten Titer nicht sehr hoch.

Zur Gewinnung eines Antikörpers gegen Angiotensin II koppelten wir nach dem Verfahren von Goodfriend et al. (42) Angiotensin II an Kaninchen Serum Albumin und immunisierten hiermit 20 weiße Neu-Seeland Kaninchen. Im Verlaufe der Immunisierung starben acht Tiere, von den restlichen zwölf bildeten elf gegen Angiotensin II gerichtete Antikörper, die sich jedoch stark in der Höhe des Titers unterschieden.

Bei der Testung der Kreuzreaktion zeigte sich, daß alle Antiseren nicht nur mit Angiotensin II, sondern auch mit einem Teil der Angiotensin II-Analogen teilweise sogar eine 100%ige Kreuzreaktion zeigten. Der zu den Untersuchungen verwendete Antikörper von Kaninchen Nr.14 differenzierte nicht zwischen $\text{Asn}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$, $\text{Asp}^1\text{-Val}^5\text{-Angiotensin II}$ und $\text{Asp}^1\text{-Ile}^5\text{-Angiotensin II}$. Auch Vallotton (98) erhielt durch Immunisierung einen Antikörper, der mit den drei oben genannten Oktapeptiden eine 100%ige Kreuzreaktion zeigte, die Kreuzreaktion gegenüber Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid betrug bei ihm 50%, bei unserem Antikörper 102%. Düsterdieck et al.(35) fanden bei einem anderen Antikörper gegenüber dem Hexapeptid sogar eine Kreuzreaktion von 118%. Gegenüber Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid fanden Düsterdieck et al.(35) eine Kreuzreaktion von 81 % und wir bei dem von uns verwendeten Antikörper eine solche von 66%. Auch Dietrich et al.(33) und Catt et al.(25) fanden, daß das C-terminale Ende von Angiotensin II für die immunologische Wirksamkeit von Bedeutung ist, und daß niedermolekulare Analoge von Angiotensin II mit unverändertem C-terminalen Ende mit Antikörpern gegen das Oktapeptid eine Kreuzreaktion zeigen. Catt et al.(25) wie auch wir konnten zeigen, daß der Antikörper nicht zwischen der α - und β -Aspartyl-Form von Angiotensin II unterscheidet. Wird hingegen das C-terminale Ende des Angiotensin II verändert, wie das bei dem um zwei Aminosäuren vergrößerten Angiotensin I der Fall ist, so findet man eine stark verminderte Immunoreaktivität. So erhielten Catt et al.(25) gegenüber Angiotensin I eine Kreuzreaktion von 2,5%, Düsterdieck et al.(35) von 0,6% und wir von 0,48 %. Der Angiotensin II Antagonist $\text{Sar}^1\text{-Ala}^8\text{-Angiotensin II}$ zeigte bei unseren Untersuchungen sogar nur eine Kreuzreaktion von 0,02 %. Da offensichtlich die N-terminalen Aminosäuren nur einen untergeordneten Einfluß auf die

Immunoreaktivität eines Angiotensin Analogen haben, bedingt offensichtlich alleine die Substitution des im natürlichen Angiotensin vorkommenden Phenylalanins durch Alanin einen fast vollständigen Verlust der Antigenität. Es ist anzunehmen, daß durch den Verlust der C-terminalen aromatischen Aminosäure, die ebenso wie das aromatische Tyrosin in Position vier eine Stabilisierung der Tertiärstruktur des Oligopeptids bedingt, eine Änderung der Tertiärstruktur und somit ein Verlust der Antigenität bedingt ist. Für die Bedeutung des Tyrosins in Position vier spricht auch, daß nach Vallotton (98) das Angiotensin II-(5-8)-tetrapeptid nur noch 1/18700 der Antigenität des Oktapeptids besitzt, während das Angiotensin II-(4-8)-pentapeptid, das die beiden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin enthält, nach unseren Untersuchungen eine Kreuzreaktion von 94,6% hat. Prinzipiell muß jedoch betont werden, daß sich verschiedene Antikörper bezüglich ihrer Kreuzreaktion unterscheiden können. So fanden Dietrich (33), Catt et al. (23), Hollemans et al. (52) und d'Auriac et al. (29) Antiseren, die zwischen Val⁵- und Ile⁵-Angiotensin II differenzierten.

Liegen für Untersuchungen des Renin-Angiotensin-Systems keine Antikörper vor, die spezifisch mit Angiotensin II reagieren oder zumindest zwischen Angiotensin II und dem wesentlichsten immunoreaktiven Metaboliten Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid differenzieren, ist es erforderlich, zur isolierten Bestimmung von Angiotensin II die niedermolekularen Analoge durch physikochemische Verfahren abzutrennen. Hierzu ist nun zunächst eine Extraktion des Angiotensin II und seiner Metabolite aus dem Plasma erforderlich. Amberlite IRC-50 hat sich hierbei als geeignet erwiesen, da es sowohl Angiotensin II wie Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid aus Plasma gut adsorbiert und die Oligopeptide lassen sich anschließend wieder fast vollständig von dem Ionenaustauscher eluieren. Bei

Recovery Versuchen fanden wir für beide Oligopeptide eine Wiederfindungsrate von ca. 98 %. Der besondere Vorteil dieses Ionenaustauschers besteht darin, daß von ihm keine immunoreaktiven Verunreinigungen eluiert werden können, die zu fälschlich hohen Ergebnissen führen. Amberlite hat jedoch den Nachteil, daß das Eluat getrübt ist und bei der dünnschichtchromatographischen Trennung zu Störungen führt. Es ist daher für Verfahren, bei denen an die Elution eine Chromatographie auf Dünnschichtplatten angeschlossen werden soll, nicht geeignet.

Fullers Erde, die von manchen Autoren zur Extraktion von Angiotensin aus Plasma verwendet wird (12,86), hat sich in unserem Laboratorium als nicht geeignet erwiesen, da die Extraktion aus Plasma nur unvollständig war.

Mit Dowex 50W-X2 fanden wir wie auch Düsterdieck et al. (35) für Angiotensin II und Angiotensin II-(5-8)-hexapeptid bei der Extraktion aus Plasma Wiederfindungsraten von annähernd 85%. Voraussetzung war jedoch, daß der Ionenaustauscher einem aufwendigen Waschprozeß unterworfen wurde, da aus nicht ausreichend vorgereinigtem Dowex immunoreaktives Material in hohen und variablen Konzentrationen eluiert werden konnte. Einschränkung muß jedoch gesagt werden, daß möglicherweise der von uns verwendete Antikörper gegenüber diesen Verunreinigungen besonders empfindlich war und eventuell andere Antiseren eine Kreuzreaktion mit diesen Verunreinigungen nicht zeigen. Der Vorteil dieses Ionenaustauschers gegenüber dem Amberlite IRC-50 besteht darin, daß die Eluate des Dowex vollkommen klar sind und bei einer anschließenden dünnschichtchromatographischen Trennung einen ungestörten Lauf gewährleisten.

Bei der Elektrofokussierung auf der Säule im Dichtegradienten und im Polyacrylamidgel lagen die isoelektrischen

Punkte von Asp¹-Val⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid etwa bei pH 6,9 und der isoelektrische Punkt von Asn¹-Val⁵-Angiotensin II bei einem pH-Wert von 7,5. Eine Trennung des natürlichen Angiotensin II von seinem niedermolekularen Metaboliten ist daher mit dieser Methode nicht möglich, jedoch kann Asp¹-Val⁵-Angiotensin II quantitativ von dem synthetischen Asn¹-Val⁵-Angiotensin II abgetrennt werden.

Das von Catt et al.(24) und Cain et al.(18,19) beschriebene Verfahren der papierchromatographischen Trennung des Angiotensin II von seinen Metaboliten hat sich bei uns als ungeeignet erwiesen, da sich aus dem Papier selbst immuno-reaktives Material in exzessiv hohen und variablen Mengen eluieren ließ. Hierbei waren die Verunreinigungen um ein Vielfaches höher als die zu bestimmenden Probemengen. Die gleichen Befunde haben auch Fernollet et al.(86) erhoben, die daher ebenfalls nach einer dünnschichtchromatographischen Methode zur Auftrennung dieser Oligopeptide gesucht haben. Wir konnten jedoch bestätigen, daß mit einem Fließmittel aus n-Butanol-Essigsäure-Acetessigsäureäthylester-Wasser eine gute Trennung von radioaktiv markiertem Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid möglich ist.

Die bei unseren Untersuchungen verwendete dünnschichtchromatographische Methode auf Kieselgel-Fertigplatten erlaubte eine exakte Trennung des Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II vom Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid und somit seine quantitative radioimmunologische Bestimmung im Plasma. Von besonderem Vorteil war, daß aus dem Träger keine immunologisch interferierenden Substanzen eluiert wurden. Eine Trennung des Angiotensin II-(2-8)-heptapeptids und des synthetischen Asn¹-Val⁵-Angiotensin II vom natürlichen Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II war jedoch mit Hilfe des von uns verwendeten Fließmittels nicht möglich. Infolge der

immunologischen Kreuzreaktion zwischen Angiotensin II und Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid schließt die radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin II diesen Metaboliten mit ein. Aus methodischen Gründen war auch die Bestimmung anderer Angiotensin-Metabolite mit Ausnahme des Angiotensin II-(3-8)-hexapeptids nicht möglich. Es soll jedoch betont werden, daß nach Untersuchungen von Cain et al.(19) das Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid der quantitativ bedeutungsvollste immunreaktive Metabolit von Angiotensin II im venösen Blut ist. Die Werte für die Recovery betrugen nach Extraktion mit Dowex 50W-X2 und anschließender Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit n-Butanol: Acetessigsäureäthylester:Wasser:Essigsäure (30:30:15:3) als Fließmittel für Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II bei 81,6% und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid bei 77,2%.

Bei der Blutentnahme wurden als Inhibitoren für die Angiotensinasen und das converting enzyme und zur Vermeidung einer Gerinnung Na₂EDTA und o-Phenanthrolin (0,5 ml einer Lösung von 0,1 mol/l Na₂EDTA und 0,05 mol/l o-Phenanthrolin für 15 ml Blut) zugesetzt. Das Blut wurde schon während der Abnahme in einem Eis - Wasser - Bad auf 0°C gekühlt, um zum einen eine Neubildung von Angiotensin II und zum anderen einen Abbau der Oligopeptide durch Angiotensinasen zu vermeiden. Düsterdieck et al.(35) konnten zeigen, daß bei diesem Vorgehen reelle und unverfälschte Plasmakonzentrationen gemessen werden.

Unter Elektrolytbilanzdiätbedingungen mit 120 bis 140 mval NaCl/die und 60 mval KCl/die betrug die Angiotensin II-Konzentration im arteriellen Plasma $45,9 \pm 5,7$ pg/ml (n = 5) und im venösen $40,1 \pm 5,8$ pg/ml (n = 5). Die Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration lag im arteriellen Plasma bei $25,7 \pm 9,9$ pg/ml (n=5)

und im venösen bei $30,9 \pm 11,1$ pg/ml ($n = 5$). Diese Werte sind bezüglich der Recovery korrigiert. Das Verhältnis von arteriellem zu venösem Angiotensin II-Spiegel beträgt $1,14 \pm 0,11 : 1$; dies besagt, daß während einer einzigen Passage des Blutes durch das periphere Kapillarbett des Unterarms ca. 12% des Angiotensin II extrahiert wurden.

Nach Salzzentzug durch einmalige intravenöse Gabe von 40 mg Furosemid und anschließender dreitägiger Diät mit 10 mval NaCl/die und 60 mval KCl/die betrug die Angiotensin II-Konzentration nach zehnstündiger Ruhe bei fünf normotonen Probanden im Alter von 20 bis 25 Jahren im arteriellen Plasma $84,9 \pm 18,1$ pg/ml und im venösen $68,3 \pm 14,2$ pg/ml. Die Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration lag arteriell bei $45,3 \pm 12,9$ pg/ml und venös bei $53,2 \pm 12,1$ pg/ml. Das Verhältnis von arteriellem zu venösem Angiotensin II-Spiegel beträgt nach Salzzentzug $1,25 \pm 0,11 : 1$; dies entspricht einer ca. 20%igen Angiotensin II-Extraktion im Kapillarbett des Armes während einer einzigen Passage.

Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von Angiotensin II in Plasmen normotensiver Personen variieren sehr stark und liegen zwischen 3 pg/ml und weit über 100 pg/ml. So fanden Goodfriend et al. (40) Werte von 5 bis 126 pg/ml, Gocke et al. (39) von 20 bis 220 pg/ml, Boyd et al. (12) von 8 bis 56 pg/ml, Sundsfjord (87) von 12 bis 59 pg/ml und Düsterdieck et al. (35) von 5 bis 35 pg/ml. Bei diesen Werten ist zu beachten, daß die Untersucher das gesamte immunreaktive Material bestimmt und somit nicht isoliert die Angiotensin II-Konzentration ermittelt haben. Prinzipiell ist zu berücksichtigen, daß die Angiotensin II-Konzentration stark von der Elektrolytzufuhr beeinflusst wird. Nach unseren Untersuchungen führte Salzzentzug zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) der arteriellen und venösen Angiotensin II-Konzentrationen.

Die arterielle Angiotensin II-Konzentration stieg von 45,9 pg/ml auf 84,9 pg/ml, was einer Steigerung um den Faktor 1,85 entspricht. Die venöse Angiotensin II-Konzentration stieg von 40,1 pg/ml um den Faktor 1,7 auf 68,5 pg/ml. Gocke et al.(39) fanden im venösen Plasma vor Salzzug eine Angiotensin II-Konzentration von 54 pg/ml und nach Salzzug eine von 163 pg/ml (Faktor 3,02). Haber et al.(47) bestimmten vor Salzzug 26 pg/ml und nach Salzzug 47 pg/ml (Faktor 1,81) und Johnston et al.(56) fanden eine Erhöhung von 28,8 pg/ml auf 40,6 pg/ml (Faktor 1,41). Aus diesen Resultaten ist ersichtlich, daß Bestimmungen der Angiotensin II-Konzentration nur unter einer definierten Elektrolytbilanzdiät sinnvoll sind und die großen Differenzen der verschiedenen Autoren sich möglicherweise auf unterschiedliche diätetische Bedingungen zurückführen lassen.

Die aus den arteriovenösen Verhältnissen berechnete Extraktionsrate für Angiotensin II lag vor Salzzug bei ca. 12% und nach Salzzug bei etwa 20%. Diese von uns gefundene Extraktion liegt erheblich niedriger als der von Cain et al.(19) und Catt et al.(24) angegebene Wert von 66%. Es ist nicht auszuschließen, daß diese starke Differenz auf methodische Gründe zurückzuführen ist. Zur Trennung des Angiotensin II von seinen Metaboliten verwendeten diese Autoren ein papierchromatographisches Verfahren. Wir wie auch Fernollet et al.(86) konnten zeigen, daß dieses Chromatographiepapier Whatman 3 MC radioimmunologisch aktive Substanzen enthält, die sich eluieren lassen und somit die Genauigkeit der Angiotensin II-Bestimmung beeinträchtigen. Nach Wisenbaugh et al.(101) ist außerdem die Extraktion von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus Chromatographiepapier selten quantitativ. Aus Untersuchungen von Fernollet et al.(86) läßt sich eine Angiotensin II-Extraktion im peripheren Kapillar-

bett von 39% berechnen. Offensichtlich wird aufgrund dieser Befunde Angiotensin II im wesentlichen durch enzymatische Hydrolyse in den Kapillaren metabolisiert, was auch durch unsere Befunde - eine erhöhte Hexapeptidkonzentration im venösen Plasma - verdeutlicht wird. Während die arterielle Angiotensin II-Konzentration im venösen Plasma um annähernd 20% fällt, steigt die venöse Hexapeptidkonzentration sowohl vor als auch nach Salzzug um ca. 25% an, woraus sich die besondere Bedeutung des Angiotensin II-(3-8)-hexapeptids als dem hauptsächlichen Metaboliten von Angiotensin II ablesen läßt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein radioimmunologisches Verfahren beschrieben, das nach Extraktion und anschließender Chromatographie die quantitative Bestimmung von Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid aus menschlichem Plasma ermöglicht. Bei fünf normotensiven männlichen gesunden Versuchspersonen im Alter von 20 bis 25 Jahren wurde aus arteriellem und venösem Plasma unter Elektrolytbilanzbedingungen (120 - 140 mval NaCl/die und 60 - 80 mval KCl/die) und nach Salzentzug (10 mval NaCl/die und 60 - 80 mval KCl/die) Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid bestimmt.

1. Zur Adsorption von Angiotensin II und seinen Metaboliten aus menschlichem Plasma ist Fuller's Erde nicht geeignet.

2. Amberlite IRC-50 zeigte bei Extraktionsversuchen aus menschlichem Plasma für Asn¹-Val⁵-Angiotensin II eine Wiederfindungsrate von 98,7% ($r = 0,9977$) und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid von 97,2% ($r = 0,9990$). Die getrockneten Eluate des Ionenaustauschers lösten sich jedoch nicht klar und beeinträchtigten bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung auf Kieselgel die Entwicklung des Chromatogramms.

3. Dowex 50W-X2 zeigte nach vorangegangener Waschung mit Natronlauge, Salzsäure und Wasser für Asn¹-Val⁵-Angiotensin II eine Wiederfindungsrate von 86,8% ($r = 0,9966$) und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid von 84,8% ($r = 0,9993$).

4. Die Elektrofokussierung im Dichtegradienten und im Polyacrylamidgel ermöglichte wegen der übereinstimmenden isoelektrischen Punkte von 6,9 - 7,0 für Asp¹-Val⁵-

Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid nicht deren Trennung. Asn¹-Val⁵-Angiotensin II ließ sich aufgrund seines isoelektrischen Punktes bei 7,5 - 8,0 von den natürlichen Oligopeptiden abtrennen.

5. Papierchromatographisch ließen sich ¹²⁵J-Asn¹-Val⁵-Angiotensin II und ¹²⁵J-Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid quantitativ auftrennen. Aus Whatman 3 MC-Chromatographiepapier ließen sich jedoch immunoreaktive Verunreinigungen in hohen und variablen Konzentrationen eluieren, die bei der Bestimmung des Angiotensin II und seiner Metabolite störten.

6. Bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten zeigte Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II einen Rf-Wert von 0,12 und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid von 0,47. Die Eluate des Dowex beeinträchtigten nicht den ungestörten Lauf während der Entwicklung des Chromatogramms. Nach Extraktion der Oligopeptide mit Dowex 50W-X2 aus Plasma und anschließender dünnschichtchromatographischer Trennung betrug die Wiederfindungsrate für Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II 81,6% (r = 0,9977) und für Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid 77,2% (r = 0,9992).

7. Zur Gewinnung von gegen Angiotensin II gerichteten Antikörpern wurden weiße Neu-Seeland Kaninchen mit Asn¹-Val⁵-Angiotensin II, das mit Carbodiimid an Kaninchen Serum Albumin gekoppelt war, immunisiert. Der bei der Untersuchung verwendete Antikörper zeigte gegenüber Asp¹-Val⁵-Angiotensin II, Asp¹-Ile⁵-Angiotensin II und Angiotensin II-(3-8)-hexapeptid eine Kreuzreaktion von 100%, gegenüber Angiotensin II-(2-8)-heptapeptid von ca. 65% und Angiotensin II-(4-8)-pentapeptid von 95%. Die immunologische Reaktivität gegenüber Angiotensin I und dem Angiotensin II-Antagonisten Sar¹-Ala⁸-Angiotensin II lag weit unter 1%.

8. Unter Elektrolytbilanzbedingungen betrug die arterielle Angiotensin II-Konzentration $45,9 \pm 5,7$ pg/ml und die venöse $40,1 \pm 5,8$ pg/ml. Die arterielle Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration lag bei $25,7 \pm 9,9$ pg/ml und die venöse bei $30,9 \pm 11,1$ pg/ml. Das Verhältnis von arteriellem zu venösem Angiotensin II betrug $1,14 \pm 0,11 : 1$, entsprechend einer Extraktionsrate von rund 12% während einer einzigen Passage durch das Kapillarbett der Peripherie.

9. Salzzentzug führte zu einem signifikanten Anstieg des arteriellen Angiotensin II-Spiegels von $45,9 \pm 5,7$ pg/ml auf $84,9 \pm 18,1$ pg/ml ($p < 0,01$) und des venösen Angiotensin II-Spiegels von $40,1 \pm 5,8$ pg/ml auf $68,3 \pm 14,2$ pg/ml ($p < 0,01$). Das arteriovenöse Verhältnis von Angiotensin II betrug $1,25 \pm 0,11 : 1$, entsprechend einer etwa 20%igen Extraktion während der Passage durch die Peripherie. Die Angiotensin II-(3-8)-hexapeptidkonzentration stieg unter Salzzentzug von $25,7 \pm 9,9$ pg/ml auf $45,3 \pm 12,9$ pg/ml im arteriellen und von $30,9 \pm 11,1$ pg/ml auf $53,2 \pm 12,1$ pg/ml im venösen Plasma.

VII. L I T E R A T U R

1. Abrams, J.S.: Blood pressure response to the portal infusion of angiotensin II. Surg.Forum XVIII, (1966), S.133
2. Arakawa, K., M. Nakamura: Studies on human angiotensin. Circulat. Res. Suppl. II 20 und 21, (1967), S.101
3. Bailie, M.D., F.C. Rector, D.W. Seldin: Angiotensin II in arterial and renal venous plasma and renal lymph in the dog. J. clin. Invest. 50, (1971), S.119
4. Bakhle, Y.S., A.M. Reynard, J.R. Vane: Metabolism of the angiotensins in isolated perfused tissues. Nature (Lond.) 222, (1969), S.956
5. Barbour, B.H., E.C. Bartter: Angiotensin labelled with ¹³¹J and with tritium. J. clin. Endocr. 23, (1963), S.313
6. Biron, P., L. Campeau: Pulmonary and extra-pulmonary fate of angiotensin I. Rev. canad. Biol. 30, (1971), S.27
7. Biron, P., L. Campeau, P. David: Fate of angiotensin I and II in the human pulmonary circulation. Amer. J. Cardiol. 24, (1969), S.544
8. Biron, P., C.G. Huggins: Pulmonary activation of synthetic angiotensin I. Life Sci. 7, (1968), S. 965
9. Biron, P., P. Meyer, J.C. Panisset: Removal of angiotensins from the systemic circulation. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 46, (1968), S.175
10. Blair-West, J.R., C.P. Coghlan, D.A. Denton, J.R. Goding, J.A. Munro, R.E. Peterson, M. Wintour: Humoral stimulation of adrenocortical secretion. J. clin. Invest. 41, (1962), S.1606
11. Boucher, R., R. Veyrat, J. de Champlain, J. Genest: New procedures for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels. Canad. med. Assoc. J. 90, (1961), S.194
12. Boyd, G.W., J. Landon, W.S. Peart: Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man. Lancet II, (1967), S.1002

13. Boyd, G.W., J. Landon, W.S. Peart: The radioimmunoassay of angiotensin II. Proc. Roy. Soc. B, (1969), S.327
14. Boyd, G.W., W.S. Peart: The production of high-titre antibody against free angiotensin II. Lancet 2, (1968), S.129
15. Bumpus, F.M., H. Schwarz, I.H. Page: Synthesis and pharmacology of octapeptide angiotensin. Science 125, (1957), S. 886
16. Bumpus, F.M., R.R. Smeby, I.H. Page, P.A. Khairallah: Distribution and metabolic fate of angiotensin II and various derivatives. Canad. Med. Ass. J. 90, (1964), S.190
17. Brunner, H.R., J.D. Kirshman, J.E. Sealey, J.H. Laragh: Hypertension of renal origin: Evidence for two different mechanisms. Science 174, (1971), S.1344
18. Cain, M.D., K.J. Catt, J.P. Coghlan: Chromatography and radioimmunoassay of angiotensin II and metabolites in blood. Biochim. Biophys. Acta 199, (1969) S.322
19. Cain, M.D., K.J. Catt, J.P. Coghlan: Effect of circulating fragments of angiotensin II on radioimmunoassay in arterial and venous plasma. J. clin. Endocrin. 29, (1969), S.1639
20. Cain, M.D., K.J. Catt, J.P. Coghlan, J.R. Blair-West: Evaluation of angiotensin II metabolism in sheep by radioimmunoassay. Endocrinology 86, (1970), S.955
21. Carretero, O.A., P. Kuk, S. Piwonska, J.A. Houle, M. Marin-Grez: Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of severe hypertension in rats. Circulat. Res. XXIX, (1971), S.654
22. Catt, K.J., M.D. Cain, J.P. Coghlan: Measurement of angiotensin II in blood. Lancet 2, (1967), S. 1005
23. Catt, K.J., M.D. Cain, J.P. Coghlan: In Protein and Polypeptide Hormones, Ed. Margoulies, M., Amsterdam: Exerpta Medica Foundation, Band 1, (1968), S.77
24. Catt, K.J., M.D. Cain, J.P. Coghlan, P.Z. Zimmet, E. Cran, J.B. Best: Metabolism and blood levels of angiotensin II in normal subjects, renal disease, and essential hypertension. Circulat. Res. Suppl. II, XXVI und XXVII, (1970), S. II-177

25. Catt, K.J., J.P. Coghlan, B. Romberg: Immunological reactivity of peptides related to angiotensin. *Nature (Lond.)* 215, (1967), S. 395
26. Chamberlain, M.J., N.L. Browse, D.G. Gibson, J.A. Gleeson: Angiotensin and renal anastomosis. *Brit. Med. J.* II, (1964), S. 1507
27. Cushman, D.W., H.S. Cheung: Concentration of angiotensin converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 250, (1971), S.261
28. Dahlheim, H., K. Petschauer, K. Thureau: Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozytenangiotensinase. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 305, (1969) S.105
29. D'Auriac, G.A., M.G. Pernollet, P. Meyer, J.M. Alexandre, P. Milliez. In: *Acquisitions Medicales Recentes*, S.187 Paris: Expansion Scientifique Francaise
30. De Bono, E., G. Lee, F.R. Mottram, G.W. Pickering: The action of angiotensin in man. *Clin. Sci.* 25, (1963), S.123
31. Dengler, H.: Über einen reninartigen Wirkstoff in Arterienextrakten. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* 227, (1956), S.481
32. Dietrich, F.M.: Immunogenicity of synthetic angiotensin II. *Int. Arch. Allergy* 30, (1966), S.497
33. Dietrich, F.M.: Immunological analysis of rabbit antibodies against angiotensin II. *Immunochemistry* 4, (1967), S. 65
34. Düsterdieck, G., McElwee, G.: Iodination of angiotensin II and purification of the labelled hormone. In: *Radioimmunoassay Methods* p.24 Edinburgh - London: Livingstone (1971)
35. Düsterdieck, G., G. McElwee: Estimation of angiotensin II concentration in human plasma by radioimmunoassay. Some applications to physiological and clinical states. *Europ. J. clin. Invest.* 2, (1971), S.32
36. Elliot, D.F., W.S. Peart: The amino acid sequence in a hypertensin. *Biochem. J.* 65, (1957), S.246

37. Ganten, D., J.L. Minnich, P. Granger, K. Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest: Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 173, (1972), S.64
38. Genest, J., W. Nowaczynski, E. Koiw, T. Sandor: Adrenocortical function in essential hypertension. In: *Essential hypertension* (Bock, K.D., P.T. Cottier), Berlin - Göttingen, - Heidelberg: Springer (1960) S. 126
39. Gocke, D.J., J. Gerten, L.M. Sherwood, J.H. Laragh: Physiological variations of plasma angiotensin II in man. *Circul. Res. Suppl. I*, Vol. 24 und 25, (1969) S.131
40. Goodfriend, T.L., D.L. Ball, D.B. Farlay: Radioimmunoassay of angiotensin. *J. Lab. clin. Med.* 72, (1968), S.648
41. Goodfriend, T.L., G. Fasman, D. Kemp, L. Levine: Immunochemical studies of angiotensin. *Immunochemistry* 3, (1966), S.223
42. Goodfriend, T.L., L. Levine, G.D. Fasman: Antibodies to bradykinin and angiotensin. A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144, (1964), S.1344
43. Gould, A.B., L.T. Skeggs, J.R. Kahn: The presence of renin activity in blood vessel walls. *J. exp. Med.* 119, (1964), S.389
44. Greenwood, F.C., W.M. Hunter, J.S. Glover: The preparation of ¹³¹J-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, (1967), S.114
45. Gross, F., G. Schaechtelin, M. Ziegler, M. Berger: A renin like substance in placenta and uterus of the rabbit. *Lancet* 1, (1964), S.914
46. Haas, E., H. Goldblatt, L. Lewis, E.C. Gipson: Inhibition of angiotensin and its protection by a cofactor in blood. *J. Physiol.* 215, (1968), S.1420
47. Haber, E., T. Koerner, L.B. Page, B. Kliman, A. Purnode: Application of radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. clin. Endroc.* 29, (1969), S.1349

48. Haber, E., L.B. Page, G.A. Jacoby: Synthesis of antigenic branch-chain copolymers of angiotensin and poly-l-lysine. *Biochemistry* 4, (1965), S.693
49. Hefferman, A.G.A., P.F. Gilliland, T.E. Prout: Studies on the development of radioimmunoassay for angiotensin II. *Irish J. med. Sci.*, Sixth Series, No. 500, (1967), S.343
50. Helmer, O.M., W.E. Judson: The quantitative determination of renin in the plasma of patients with arterial hypertension. *Circulation* XXVII, (1963), S.1050
51. Hodge, R.L., K.K.F. Ng, J.R. Vane; Disappearance of angiotensin from the circulation of the dog. *Nature (Lond.)* 215, (1967), S.138
52. Hollemans, H.C.G., J. Van der Meer, J.L. Touber: Radioimmunoassay of angiotensin. *Nature* 217, (1968), S.277
53. Itskowitz, H.D., L.D. Miller: Differential studies of angiotensinase activities from several tissue sources. *Amer. J. Med. Sci.* 254, (1967), S.659
54. Johnson, D.C.: The selective inactivation of angiotensinase activity. Thesis, University of Oxford (1967)
55. Johnson, D.C., J.W. Ryan: Degradation of angiotensin II by a carboxypeptidase of rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* 160, (1968), S.196
56. Johnston, C.J., E.A.C. Mendelsohn, A.E. Doyle: The metabolism of angiotensin II in sodium depletion and hypertension in humans. *Circul. Res. Suppl. II*, XXX und XXXI, (1972), S.203
57. Kahn, J.R., L.T. Skeggs, N.P. Shumway, P.E. Wisenbaugh: The assay of hypertensin from the arterial blood of normotensive and hypertensive human beings. *J. exp. Med.* 95, (1952), S.523
58. Khairallah, P.A., F.M. Bumpus, I.H. Page, R.R. Smeby: Angiotensinase with a high degree of specificity in plasma and red cells. *Science* 140, (1963), S.672
59. Khairallah, P.A., I.H. Page: Plasma angiotensinases. *Biochem. Med.* 1, (1967), S.1

60. Kokubu, T., H. Akutsu, S. Fujimoto, E. Ueda, K. Hiwada, Y. Yamamura: Purification and properties of endopeptidase from rabbit red cells and its degradation of angiotensin. *Biochim. Biophys. Acta* 191, (1969), S.668
61. Laragh, J.H., M. Argers, W.G. Kelly, S. Liebermann: Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II and others on the secretory rate of aldosterone in man. *J. Amer. med. Ass.* 174, (1960), S.234
62. Leary, W.P., J.G. Ledingham: Removal of angiotensin by isolated perfused organs of the rat. *Nature* 222, (1969), S.959
63. Leary, W.P.P., J.G.G. Ledingham: Renal and hepatic inactivation of angiotensin in rats: Influence of sodium balance and renal artery compression. *Clin. Sci.* 38, (1970), S.573
64. Lee, H.J., J.N. Larue, I.B. Wilson: Human plasma converting enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 142, (1971), S. 548
65. Lentz, K.E., L.T. Skeggs, K.R. Woods, J.R. Kahn, N.P. Shumway: The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. *J. exp. Med.* 104, (1956), S.183
66. Menning, J.M., S. Moore: Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J. biol. Chem.* 243, (1968), S.5591
67. Massani, Z.M., S. Finkielman, M. Worcel, A. Agrest, A.C. Paladini: Angiotensin blood levels in hypertensive and non-hypertensive diseases. *Clin. Sci.* 30, (1966), S.473
68. Matsunaga, M.: Nature of lysosomal angiotensinase activity. *Jap. Circulat. J.* 35, (1971), S.333
69. Methot, A.L., P. Meyer, P. Biron, M.F. Lorain, G. Lagrue, P. Milliez: Hepatic inactivation of angiotensin. *Nature (Lond.)* 203, (1964), S.531

70. Morris, R.E., P.R. Robinson: A method for determination of angiotensin II in human blood. Bull. Johns Hopk. Hosp. 114, (1964), S.127
71. Murlow, P.J., B. Lytton, H.C. Stanzel: The role of the renin-angiotensin system in the hypertension associated with renal vascular disease. In: L'Hypertension Arterielle, Paris: L'Expansion Scientifique Francais, (1966), S.296
72. Nast, H.P., A. Distler, G. Schreiber, U. Walter: Inaktivierung von α -L-Asparaginyll-Angiotensin II durch Erythrozyten bei Gesunden, bei verschiedenen Hochdruckformen und bei Lebererkrankungen. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 12, (1974), S.210
73. Nast, H.P., A. Distler, U. Walter: Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit von α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II-spaltenden Aminopeptidasen menschlicher Erythrozyten. In Vorbereitung.
74. Nasjletti, A., G.M.C. Masson; Studies on renin substrate formation in a liver perfusion system. Circul. Res. (1972)
75. Ng, K.K.F., J.R. Vane: Conversion of angiotensin I to angiotensin II. Nature 216, (1967), S.762
76. Oelkers, W., G. Düsterdieck, J.J. Morton: Arterial angiotensin II and venous immunoreactive material before and during angiotensin infusion in man. Clin. Sci. 43, (1972), S.209
77. Ogino, K., M. Matsunaga, N. Saito, J. Kira, M. Takayasu: Renin and acid adenosine triphosphatase as lysosomal enzymes. Jap. Circulat. J. 31, (1967), S. 1
78. Osborn, E.C., S.G. Hughes, A.T. Purie, P.R. Willicombe, R.F. Mahler: Clearance studies of angiotensin II and (³⁵S)phenylthiocarbonyl-angiotensin II in the sheep and dog. Cardiovasc. Res. 3, (1969), S.134

79. Osborn, E.C., G. Jerums, B.A. Jupp: Blood angiotensinase activity in relation to the breakdown of angiotensin II-amide and nonisotopic phenylthiocarbonyl-angiotensin II-amide in hypertensive and normotensive patients. *Cardiovasc. Res.* 2, (1968), S.33
80. Osborne, J.M., A.D'Auriac, P. Meyer, M.Worcel: Mechanism of extraction of angiotensin II in coronary and renal circulations. *Life sci.* 9, (1970), S.859
81. Osborne, J.M., N. Pooters, G.A. D'Auriac, A.N. Epstein, M. Worcel, P. Meyer: Metabolism of tritiated angiotensin in anaesthetized rats. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 326, (1971), S. 101
82. Page, I.H., J.W. McCubbin; Renal hypertension. Chicago: Year Book Medical Publishers, (1968), S.50
83. Page, I.H., B. McSwain, G.M. Knapp, W.D. Andrus: The origin of renin activator. *Amer. J. Physiol.* 135, (1941), S.214.
84. Paladini, A.C., E. Braun-Mendenez, I.S. Del Frade, Z.M. Massani: The estimation of angiotensin in blood. *J. Lab. clin. Med.* 53, (1959), S.264
85. Peart, W.S.: A new method of large scale preparation of hypertensin with a note on its assay. *Biochem. J.* 59, (1955), S.300
86. Pernollet, M.G., G.A. D'Auriac, P. Meyer: Improved technique for radioimmunoassay of angiotensin II in plasma. *Rec. Europ. Etudes Clin. et Biol.* XVII, (1972), S.111
87. Pierach, G.A., M.E. Jacobson, K.L. Carlson: Radioimmunologische Angiotensinbestimmung. *Ver. dtsh. Ges. inn. Med.* 75, (1969), S.191
88. Piquilloud, Y., A. Reinharz, M. Roth: Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 206, (1970), S.136
89. Plentl, A.A., I.H. Page, B.W. Davis: The nature of renin activator. *J. Biol. Chem.* 147, (1943), S.143

90. Poulsen, J., J. Bing: Species specific differences in converting enzyme and angiotensin I. Acta path. Microbiol. Scand. Section A 78, (1970), S. 665
91. Poulsen, J., L.L. Poulsen: Simultaneous determination of plasma converting enzyme and angiotensinase activity by radioimmunoassay. Clin. Sci. 40, (1971), S.443
92. Rosskamp, E., W. Kaufmann: Radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin II. Klin. Wschr. 49, (1971), S.876
93. Ryan, J.W., J.K. McKenzie, M.R. Lee: A rapid simple method for the estimation of plasma renin activity in the rabbit. Proc. III International Congr. of Nephrology, Abstract (1966)
94. Ryan, J.W., J.K. McKenzie, M.R. Lee: A rapid simple method for the assay of renin in rabbit plasma. Biochem. J. 108, (1968), S.679
95. Skeggs, L.T., J.R. Kahn, N.P. Shumway: The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. J. exp. Med. 103, (1965), S.295
96. Skeggs, L.T., K.E. Lentz, J.R. Kahn, N.P. Shumway, K.R. Woods: The amino acid sequence of hypertensin II. J. exp. Med. 104, (1956), S.193
97. Sundsfjord, J.A.: Radioimmunoassay of angiotensin II in plasma. Acta endocrin. 64, (1970), S.181
98. Vallotton, M.B.: Relationship between chemical structure and antigenicity of angiotensin analogues. Immunochemistry 7, (1970), S.529
99. Vallotton, M.B., L.B. Page, E. Haber: Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma. Nature 215, (1967), S.714
100. Weiser, R.A., A.G. Johnson, S.W. Hoobler: The effect of antirenin on the blood pressure of the rat with experimental renal hypertension. Lab. Invest. 20, (1969), S.326
101. Wisenbaugh, P.E., E.N. Willis, R.W. Hill: Paper chromatographic identifications of angiotensin. Amer. J. Physiol. 207, (1964), S.759

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. H.P. Wolff möchte ich dafür danken, daß durch seine Hilfe die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde.

Herrn Prof. Dr. A. Distler danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine freundliche Unterstützung.

Frau Dipl. Mathematikerin D. Müller, Institut für Statistik und Dokumentation der Johannes Gutenberg Universität Mainz, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 22.2.1943 wurde ich als zweiter Sohn des Oberforstmeisters Fritz Walter und dessen Ehefrau Luise, geb. Rau, in Deutsch-Eylau geboren. Nach der Flucht wurde ich 1949 in Bobenhausen eingeschult. Drei weitere Grundschuljahre absolvierte ich in Raunheim und wechselte von dort 1953 auf das Realgymnasium in Rüsselsheim über. Nach der Übersiedlung meiner Eltern nach Bad König besuchte ich von 1954 an das Gymnasium in Michelstadt, wo ich 1962 im naturwissenschaftlichen Zweig das Abitur bestand. 1962 begann ich mit dem Chemiestudium an der Johannes-Gutenberg Universität in Mainz; 1965 bestand ich das Vordiplom. Seit 1966 studierte ich als zweites Fach Medizin. 1966 bestand ich das Vorphysikum und 1967 die mündliche Diplomprüfung in Chemie. Am Institut für Biochemie fertigte ich meine Diplom- und Doktorarbeit an. Seit 1968 bin ich Diplomchemiker und promovierte 1970 mit summa cum laude. 1969 bestand ich das Physikum und wurde im gleichen Jahr mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für Biochemie beauftragt. Von 1970 bis 1971 war ich hier Assistent und wechselte nach der Emeritierung von Herrn Prof.Dr. Albers in die I.Med.Klinik der Universität Mainz über. Hier hatte ich zunächst eine Stelle von der DFG, wurde 1972 zum wissenschaftlichen Assistenten und 1973 zum Assistenzprofessor ernannt. Im Juni 1974 bestand ich das Staatsexamen in Medizin.

70. Morris, R.E., P.R. Robinson: A method for determination of angiotensin II in human blood. Bull. Johns Hopk. Hosp. 114, (1964), S.127
71. Murlow, P.J., B. Lytton, H.C. Stanzel: The role of the renin-angiotensin system in the hypertension associated with renal vascular disease. In: L'Hypertension Arterielle, Paris: L'Expansion Scientifique Francais, (1966), S.296
72. Nast, H.P., A. Distler, G. Schreiber, U. Walter: Inaktivierung von α -L-Asparaginyll-Angiotensin II durch Erythrozyten bei Gesunden, bei verschiedenen Hochdruckformen und bei Lebererkrankungen. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 12, (1974), S.210
73. Nast, H.P., A. Distler, U. Walter: Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit von α -L-Asparaginyll¹-Angiotensin II-spaltenden Aminopeptidasen menschlicher Erythrozyten. In Vorbereitung.
74. Nasjletti, A., G.M.C. Masson; Studies on renin substrate formation in a liver perfusion system. Circul. Res. (1972)
75. Ng, K.K.F., J.R. Vane: Conversion of angiotensin I to angiotensin II. Nature 216, (1967), S.762
76. Oelkers, W., G. Düsterdieck, J.J. Morton: Arterial angiotensin II and venous immunoreactive material before and during angiotensin infusion in man. Clin. Sci. 43, (1972), S.209
77. Ogino, K., M. Matsunaga, N. Saito, J. Kira, M. Takayasu: Renin and acid adenosine triphosphatase as lysosomal enzymes. Jap. Circulat. J. 31, (1967), S. 1
78. Osborn, E.C., S.G. Hughes, A.T. Purie, P.R. Willicombe, R.F. Mahler: Clearance studies of angiotensin II and (³⁵S)phenylthiocarbonyl-angiotensin II in the sheep and dog. Cardiovasc. Res. 3, (1969), S.134

79. Osborn, E.C., G. Jerums, B.A. Jupp: Blood angiotensinase activity in relation to the breakdown of angiotensin II-amide and nonisotopic phenylthiocarbonyl-angiotensin II-amide in hypertensive and normotensive patients. *Cardiovasc. Res.* 2, (1968), S.33
80. Osborne, J.M., A.D'Auriac, P. Meyer, M.Worcel: Mechanism of extraction of angiotensin II in coronary and renal circulations. *Life sci.* 9, (1970), S.859
81. Osborne, J.M., N. Pooters, G.A. D'Auriac, A.N. Epstein, M. Worcel, P. Meyer: Metabolism of tritiated angiotensin in anaesthetized rats. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 326, (1971), S. 101
82. Page, I.H., J.W. McCubbin; Renal hypertension. Chicago: Year Book Medical Publishers, (1968), S.50
83. Page, I.H., B. McSwain, G.M. Knapp, W.D. Andrus: The origin of renin activator. *Amer. J. Physiol.* 135, (1941), S.214
84. Paladini, A.C., E. Braun-Mendenez, I.S. Del Frade, Z.M. Massani: The estimation of angiotensin in blood. *J. Lab. clin. Med.* 53, (1959), S.264
85. Peart, W.S.: A new method of large scale preparation of hypertensin with a note on its assay. *Biochem. J.* 59, (1955), S.300
86. Pernollet, M.G., G.A. D'Auriac, P. Meyer: Improved technique for radioimmunoassay of angiotensin II in plasma. *Rec. Europ. Etudes Clin. et Biol.* XVII, (1972), S.111
87. Pierach, G.A., M.E. Jacobson, K.L. Carlson: Radioimmunologische Angiotensinbestimmung. *Ver. dtsch. Ges. inn. Med.* 75, (1969), S.191
88. Piquilloud, Y., A. Reinharz, M. Roth: Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 206, (1970), S.136
89. Plentl, A.A., I.H. Page, B.W. Davis: The nature of renin activator. *J. Biol. Chem.* 147, (1943), S.143

90. Poulsen, J., J. Bing: Species specific differences in converting enzyme and angiotensin I. Acta path. Microbiol. Scand. Section A 78, (1970), S. 665
91. Poulsen, J., L.L. Poulsen: Simultaneous determination of plasma converting enzyme and angiotensinase activity by radioimmunoassay. Clin. Sci. 40, (1971), S.443
92. Rosskamp, E., W. Kaufmann: Radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin II. Klin. Wschr. 49, (1971), S.876
93. Ryan, J.W., J.K. McKenzie, M.R. Lee: A rapid simple method for the estimation of plasma renin activity in the rabbit. Proc. III International Congr. of Nephrology, Abstract (1966)
94. Ryan, J.W., J.K. McKenzie, M.R. Lee: A rapid simple method for the assay of renin in rabbit plasma. Biochem. J. 108, (1968), S.679
95. Skeggs, L.T., J.R. Kahn, N.P. Shumway: The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. J. exp. Med. 103, (1965), S.295
96. Skeggs, L.T., K.E. Lentz, J.R. Kahn, N.P. Shumway, K.R. Woods: The amino acid sequence of hypertensin II. J. exp. Med. 104, (1956), S.193
97. Sundsfjord, J.A.: Radioimmunoassay of angiotensin II in plasma. Acta endocrin. 64, (1970), S.181
98. Vallotton, M.B.: Relationship between chemical structure and antigenicity of angiotensin analogues. Immunochemistry 7, (1970), S.529
99. Vallotton, M.B., L.B. Page, E. Haber: Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma. Nature 215, (1967), S.714
100. Weiser, R.A., A.G. Johnson, S.W. Hoobler: The effect of antirenin on the blood pressure of the rat with experimental renal hypertension. Lab. Invest. 20, (1969), S.326
101. Wisenbaugh, P.E., E.N. Willis, R.W. Hill: Paper chromatographic identifications of angiotensin. Amer. J. Physiol. 207, (1964), S.759

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. H.P. Wolff möchte ich dafür danken, daß durch seine Hilfe die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde.

Herrn Prof. Dr. A. Distler danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine freundliche Unterstützung.

Frau Dipl. Mathematikerin D. Müller, Institut für Statistik und Dokumentation der Johannes Gutenberg Universität Mainz, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 22.2.1943 wurde ich als zweiter Sohn des Oberforstmeisters Fritz Walter und dessen Ehefrau Luise, geb. Rau, in Deutsch-Eylau geboren. Nach der Flucht wurde ich 1949 in Bobenhausen eingeschult. Drei weitere Grundschuljahre absolvierte ich in Raunheim und wechselte von dort 1953 auf das Realgymnasium in Rüsselsheim über. Nach der Übersiedlung meiner Eltern nach Bad König besuchte ich von 1954 an das Gymnasium in Michelstadt, wo ich 1962 im naturwissenschaftlichen Zweig das Abitur bestand. 1962 begann ich mit dem Chemiestudium an der Johannes-Gutenberg Universität in Mainz; 1965 bestand ich das Vordiplom. Seit 1966 studierte ich als zweites Fach Medizin. 1966 bestand ich das Vorphysikum und 1967 die mündliche Diplomprüfung in Chemie. Am Institut für Biochemie fertigte ich meine Diplom- und Doktorarbeit an. Seit 1968 bin ich Diplomchemiker und promovierte 1970 mit summa cum laude. 1969 bestand ich das Physikum und wurde im gleichen Jahr mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für Biochemie beauftragt. Von 1970 bis 1971 war ich hier Assistent und wechselte nach der Emeritierung von Herrn Prof.Dr. Albers in die I.Med.Klinik der Universität Mainz über. Hier hatte ich zunächst eine Stelle von der DFG, wurde 1972 zum wissenschaftlichen Assistenten und 1973 zum Assistenzprofessor ernannt. Im Juni 1974 bestand ich das Staatsexamen in Medizin.

